



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**



DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**“ROTTURA PREMATURA DELLA MEMBRANA FETALE:
APPROCCI ALLA RIPARAZIONE ATTRAVERSO L'UTILIZZO DI
BIOMATERIALI”**

Relatore: Prof. Andrea Bagno

Laureanda: Chiara Biasiolo

ANNO ACCADEMICO 2023 – 2024

Data di laurea 17/07/2024

Abstract	4
Introduzione	5
Capitolo 1. Descrizione della membrana fetale	7
1.1 Formazione e sviluppo.....	7
1.2 Organizzazione e struttura	8
1.2.1 Amnion	8
1.2.2 Chorion	9
1.3 Ruolo nella gravidanza e nello sviluppo fetale.....	10
Capitolo 2. Rottura prematura della membrana fetale (PROM)	11
2.1 Rottura iatrogena	12
2.1.1 Fattori di rischio e processi coinvolti nella rottura	13
2.1.2 Caratteristiche della ferita	14
2.2 Rottura spontanea	15
2.2.1 Fattori di rischio e processi coinvolti nella rottura	15
2.2.2 Caratteristiche della ferita	18
2.3 Conseguenze per la madre e il feto.....	18
Capitolo 3. Trattamenti attuali per la rottura prematura della membrana.....	20
3.1 Diagnosi.....	20
3.2 Terapie	21
3.2.1 Antibiotici	21
3.2.2 Corticosteroidi.....	21
3.2.3 Tocolisi	22
3.3 Trattamenti in base all'età gestazionale	22
3.3.1 Da 34 a 36 settimane di gestazione.....	22
3.3.2 Da 32 a 33 settimane di gestazione.....	23
3.3.3 Da 24 a 31 settimane di gestazione.....	23
3.3.4 Meno di 34 settimane di gestazione.....	23

Capitolo 4. Possibili metodi di riparazione con l'utilizzo di biomateriali	25
4.1 Amniopatch	25
4.2 Collagen plug.....	26
4.3 Fibrin sealants.....	28
4.4 Mussel glue.....	30
Capitolo 5. Casi di studio sull'utilizzo dei possibili metodi di riparazione	32
5.1 Amniopatch	32
5.1.1 Applicazione in vivo in caso di PROM iatrogena a 20 settimane di gestazione	32
5.1.2 Applicazione in vivo in 7 casi di PROM spontanea	32
5.2 Collagen plug.....	36
5.2.1 Studio del collagen plug con shape memory	36
5.2.2 Studio del collagen plug arricchito con plasma e fibrinogeno.....	39
5.3 Fibrin sealants.....	40
5.3.1 Applicazione in vivo in 7 casi di PROM a meno di 24 settimane di gestazione	40
5.3.2 Applicazione in vivo in caso di PROM a 20 settimane di gestazione	42
5.4 Mussel glue.....	42
5.4.1 Confronto ex vivo di mussel glue e fibrin sealant	42
5.4.2 Applicazione in vivo su conigli combinando mussel glue o fibrin sealant e DAM	44
5.4.3 Applicazione in vivo su pecore alpine utilizzando un supporto in nitinol.....	46
Conclusioni.....	48
Bibliografia.....	50

Abstract

La rottura prematura della membrana fetale (Premature Rupture Of Membranes, PROM) è una complicanza ostetrica significativa, con un tasso di incidenza nelle gravidanze di circa il 3-4%. In particolare, in seguito a procedure diagnostiche, come l'amniocentesi, o ad interventi fetoscopici, nei quali la membrana fetale viene perforata, l'avvento di PROM è notevolmente frequente. La conseguenza principale della PROM è la nascita prematura dei feti, con i gravi rischi associati alla loro salute e sopravvivenza.

Attualmente, l'approccio principale nella gestione di questa problematica consiste nel trattamento con antibiotici e corticosteroidi, al fine di allungare il più possibile il tempo di gestazione e ridurre le severità delle conseguenze sulla salute dei nati. Tuttavia, questi approcci tendono ad affrontare la condizione in modo prevalentemente sintomatico, senza risolvere la causa sottostante. Inoltre, una soluzione di questo tipo mantiene comunque significativamente alti i rischi di sviluppare infezioni intra-amniotiche e disabilità fisiche e/o neurologiche nei nati.

Per questi motivi, è importante sviluppare tecniche più innovative e mirate soprattutto a ripristinare l'integrità e la funzione di barriera della membrana fetale, per migliorare l'efficacia e la sicurezza della gestione clinica della PROM e estendere l'utilizzo della fetoscopia, portando così maggiori benefici.

Dopo aver esplorato la complessità della membrana fetale, analizzandone struttura e funzione, ed esaminato le principali cause, conseguenze e tecniche attuali di gestione della PROM, questa tesi si concentra sulla ricerca e la valutazione di tecniche innovative per la riparazione della membrana, sfruttando i biomateriali. Verranno principalmente esaminati quattro diversi approcci: l'utilizzo di Amniopatch, di collagen plug, di fibrin sealant e di mussel glue, eventualmente con il supporto o l'aggiunta di altri componenti. Tali procedure saranno descritte e, successivamente, studiate nel dettaglio e confrontate tra loro, attraverso l'analisi di diversi studi clinici e preclinici, per poterne valutare l'efficacia.

Introduzione

La membrana fetale, composta dall'amnion e dal chorion, comincia il suo sviluppo subito dopo l'impianto dell'embrione e assume un ruolo cruciale durante tutto il corso della gravidanza, avvolgendo, proteggendo e supportando il feto fino alla nascita.

Il termine della gravidanza è segnato dal fenomeno noto come "rottura delle acque", ossia la rottura meccanica della membrana fetale come processo naturale e necessario per dare inizio al travaglio [1]. Tuttavia, quando tale evento si verifica prematuramente, le conseguenze possono essere significative, esponendo madre e feto a gravi rischi per la loro salute e, talvolta, per la loro stessa vita.

La rottura prematura della membrana fetale (Premature Rupture Of Membranes, PROM), a meno di 37 settimane di gestazione, avviene circa nel 3-4% di tutte le gravidanze e precede circa la metà di tutte le nascite premature [2].

Più precoce è la PROM, maggiori sono i rischi di morbilità e mortalità. Ad esempio, nel caso in cui essa avvenga prima che siano trascorse 24 settimane di gestazione, il tasso di sopravvivenza del feto è circa del 26-80% e circa un terzo dei neonati ha disabilità o ritardi nello sviluppo [1,3].

Nonostante i progressi significativi in medicina fetale negli ultimi decenni, la rottura prematura pretermine della membrana rimane una complicanza troppo spesso sottovalutata. Inoltre, accanto alla rottura spontanea, numerosi sono i casi di rottura iatrogena della membrana fetale a seguito di procedure chirurgiche e diagnostiche; essa avviene, ad esempio, nel 45% dei casi successivi all'utilizzo del fotoscopio [2,4].

Le cause precise della rottura spontanea non sono ancora completamente note. Una buona percentuale dei casi è associata ad infezioni; altri sono legati a fattori ambientali e comportamentali, come malnutrizione, fumo o stress; altri ancora a predisposizioni genetiche o complicanze ostetriche [2,5].

Le conseguenze includono, ad esempio, emorragie intraventricolari o infezioni neonatali, come polmonite o sepsi, il cui tasso di mortalità è circa del 5% [6,7].

Affrontare efficacemente la PROM richiede un approccio complessivo che comprenda sia la diagnosi tempestiva che opzioni terapeutiche innovative.

Ad oggi, le pazienti affette vengono tenute sotto osservazione in ospedale e trattate con antibiotici e corticosteroidi in modo da prolungare il più possibile la gravidanza, che, nella maggior parte dei casi, giunge comunque al termine dopo non più di sette giorni [7,8].

Solo in una piccola percentuale di casi si verifica la riparazione spontanea e il proseguimento della gravidanza fino al termine [5].

L'innovazione nel settore dei biomateriali sta emergendo come campo promettente per offrire nuove soluzioni. Diversi sono infatti i metodi testati per riparare la membrana fetale dopo una rottura spontanea o iatrogena, come ad esempio l'utilizzo di amniopatch, collagen plug, mussel glue o fibrin sealant, di cui si parlerà in seguito; nessuno di questi ha però ancora raggiunto un successo clinico significativo.

Numerosi sono gli ostacoli che si devono superare: l'esiguo spessore delle membrane, l'ambiente umido, la difficoltà nella localizzazione e nel raggiungimento della ferita, la necessità di sigillanti iniettabili e la difficoltà della guarigione.

Evidente è quindi la necessità di trovare o sviluppare un materiale che sia al contempo con proprietà meccaniche in grado di adattarsi ai cambiamenti continui delle membrane fetali durante la gravidanza [3,4,9].

Dopo una breve descrizione della struttura e della funzione della membrana fetale, questa tesina esaminerà nel dettaglio la rottura prematura di quest'ultima come fenomeno patologico. Saranno analizzate le cause, le conseguenze e le attuali opzioni terapeutiche disponibili. Particolare attenzione sarà rivolta al ruolo emergente dei biomateriali nella riparazione delle membrane fetali danneggiate. Attraverso l'analisi di diversi casi di studio sulle più recenti innovazioni in campo biomedico, questo lavoro avrà l'obiettivo di fornire una panoramica completa sulle potenzialità e le sfide nell'utilizzo dei biomateriali per la gestione della PROM.

Capitolo 1. Descrizione della membrana fetale

La membrana fetale è composta da due strati principali: l'amnion, la membrana interna più vicina al feto, e il chorion, la membrana esterna che si collega alla placenta. Tali strati sono connessi da una matrice extracellulare ricca di collagene [2] e, durante la gravidanza, formano la sacca che contiene il fluido amniotico [10].

1.1 Formazione e sviluppo

Le due membrane, costituite interamente da tessuto fetale e geneticamente identiche al feto [10,11], cominciano il loro sviluppo con l'embriogenesi, procedendo gradualmente attraverso una serie di fasi e processi che si susseguono nel corso delle settimane di gestazione. Tale processo non avviene però simultaneamente, ma piuttosto in maniera graduale e stratificata, coinvolgendo il progressivo sviluppo degli strati membranosi che costituiscono le sacche (Figura 1.1) [12].

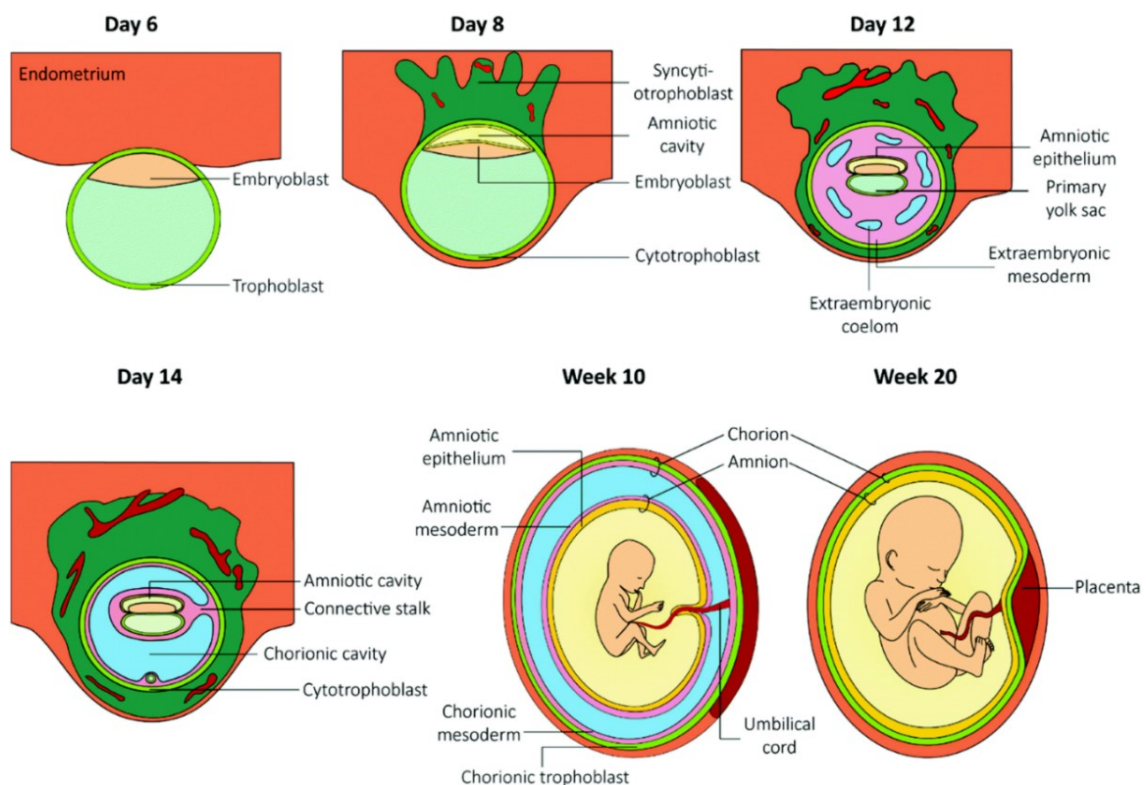


Figura 1.1: Sviluppo della membrana fetale.

Poco dopo l'impianto, si forma il disco embrionale bilaminare circondato dal trofoblasto, uno strato di cellule che darà poi origine alla placenta (giorno 6). Durante la seconda settimana di sviluppo si forma la base della cavità amniotica (giorno 8).

Intorno al 12° giorno dal concepimento, il disco embrionale si compone di due strati cellulari che circondano parzialmente il sacco vitellino primario e sono avvolti dal mesoderma extraembrionale, all'interno del quale compaiono le prime invaginazioni della cavità coriale (giorno 12). La cavità coriale si forma intorno alla fine della seconda settimana (giorno 14).

Con la progressione della crescita fetale, il mesoderma extraembrionale si divide in due strati: uno esterno che si fonde con il citotrofoblasto per formare il chorion e uno interno che riveste l'epitelio amniotico dando origine all'amnion (settimana 10) [13].

Poiché la sacca dell'amnion che avvolge l'embrione in sviluppo si espande più rapidamente del chorion, la cavità coriale gradualmente scompare fino a quando, intorno alla 14^a-17^a settimana di gestazione, le due membrane si uniscono completando la formazione della membrana fetale come struttura unica (settimana 20) [12,13,14].

1.2 Organizzazione e struttura

Le membrane fetali sono elastiche, resistenti, non innervate e semipermeabili [13]. L'amnion è completamente privo di vasi sanguigni mentre all'interno del chorion passano alcuni vasi ombelicali diretti alla placenta che, man mano che la gravidanza progredisce, si atrofizzano completamente. Il chorion non riceve però alcun apporto sanguigno da essi.

Per quanto riguarda lo scambio di fluidi tra i compartimenti amniotico e materno, dall'osservazione al microscopio elettronico dell'amnion si evince come questo avvenga principalmente attraverso le cellule epiteliali [10,15].

1.2.1 Amnion

L'amnion è un tessuto complesso, tipicamente spesso da 0.02 a 0.5 cm e costituito da cinque strati: epitelio, membrana basale, strato compatto, strato di fibroblasti e strato spongioso (Figura 1.2).

Lo strato epiteliale è quello più interno ed è costituito da cellule cuboidali sormontate da microvilli. La base di tali cellule è complessa e irregolare, complicata dalla presenza di diversi processi basali di diverse grandezze che protendono e sono strettamente in contatto con la membrana basale. Tra le diverse cellule è presente una complessa rete di canali e canalicoli che comunicano direttamente con lo spazio extracellulare e all'interno dei quali si protendono un numero inferiore di microvilli.

La membrana basale è uno strato sottile composto da collagene di tipo III, IV e V, laminina, entactina e fibronectina.

Lo strato compatto conferisce all'amnion la maggior parte della sua resistenza, è quasi completamente privo di cellule e consiste in una complessa rete di fibre reticolari.

Quando l'amnion si infiamma, lo strato compatto resiste, fino ad una certa soglia, alla penetrazione dei leucociti.

Lo strato di fibroblasti è il più spesso dell'amnion ed è costituito da una rete poco compatta di fibroblasti immersa in una massa di reticolina.

Lo strato spongioso contiene un numero elevato di proteoglicani, glicoproteine e collagene di tipo III. Tale strato assorbe lo stress fisico e consente all'amnion di scivolare sul chorion che è invece fisso e aderente alla decidua materna [10,13,15].

1.2.2 Chorion

Il chorion è più spesso, più ricco di cellule e meno organizzato dell'amnion. Si trova tra l'amnion e la decidua materna ed è responsabile del mantenimento dell'immunosoppressione del feto. Il chorion è composto da quattro strati: strato cellulare, strato reticolare, membrana pseudo-basale e strato di trofoblasti (Figura 1.2).

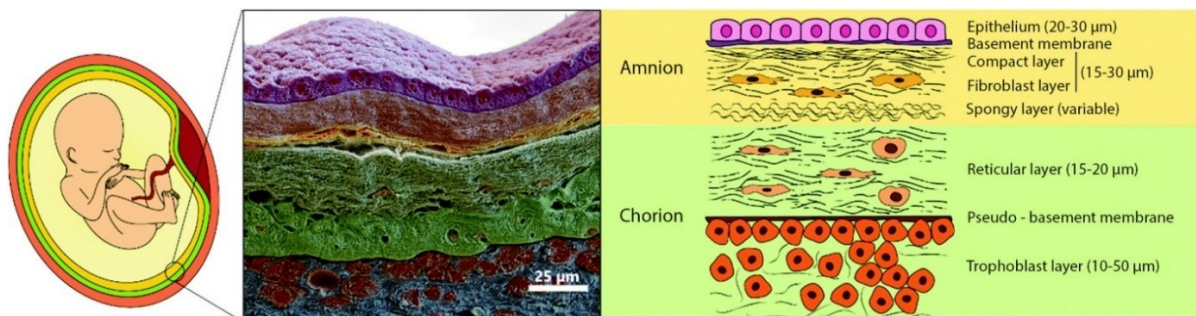


Figura 1.2: Strati delle membrane fetali al termine della gravidanza (in assenza dello strato cellulare nel chorion).

Lo strato cellulare è sottile, costituito da una rete di fibroblasti intrecciati e solitamente si trova soltanto nei primi stadi della gravidanza.

Lo strato reticolare conferisce al chorion la maggior parte del suo spessore ed è caratterizzato da una rete reticolare di fibre parallele di collagene di tipo I, III, IV, V, VI e proteoglicani; tra le fibre si trovano alcuni fibroblasti e cellule di Hofbauer.

La membrana pseudo-basale funge da ancoraggio per lo strato di trofoblasti. Si tratta di un denso strato di tessuto connettivo, ricco di collagene di tipo IV, fibronectina e laminina, strettamente aderente allo strato reticolare soprastante.

Lo strato di trofoblasti è composto da 2 a 10 strati cellulari, contiene i villi coriali ed è in contatto, nello strato più esterno, con la decidua materna [10,13,15].

1.3 Ruolo nella gravidanza e nello sviluppo fetale

La membrana fetale svolge un ruolo cruciale nella protezione del feto, nel garantire il proseguimento della gravidanza, nel consentire il passaggio di acqua, farmaci e nutrienti e funge inoltre da segnalatore per l'inizio del parto [16,17].

Durante la gravidanza, la funzione principale è quella di barriera protettiva contro diversi fattori di rischio che potrebbero indurre una risposta infiammatoria nel feto. È quindi importante che le proprietà immunologiche, infiammatorie e meccaniche delle due membrane siano preservate nel tempo.

L'amnion funge prevalentemente da barriera, supportando le deformazioni, lo stress meccanico e la crescita del feto, contrastando le infezioni e promuovendo il rimodellamento cellulare e del collagene al fine di mantenere l'omeostasi della matrice cellulare.

Il chorion ha invece come scopo principale quello di mantenere l'omeostasi delle cellule immunitarie all'interfaccia con la decidua, attraverso l'espressione e la produzione di segnalatori endocrini e paracrini (come il progesterone e l'interleuchina-10) che promuovono la transizione cellulare (mesenchimale-epiteliale) al fine di sostituire le cellule eliminate.

Al termine della gestazione, la membrana fetale dà avvio ad una serie di meccanismi paralleli per passare dall'omeostasi ad uno stato pro-infiammatorio, contribuendo così all'avvio del parto.

Entrambe le membrane, l'amnion e il chorion, iniziano a propagare segnali infiammatori attraverso microfessure (fessure tra gli strati di collagene) e grazie al rilascio e alla migrazione di esosomi, inducendo così stress ossidativo che contribuisce a sua volta all'indebolimento dell'amnion e alla degradazione del chorion.

Nonostante i processi che conducono all'avvento del parto siano diversi, il ruolo più importante è forse quello svolto dalle prostaglandine, come la prostaglandina E₂ (PGE₂) e la prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}), che, mediante la degradazione del collagene, portano alla contrazione del miometrio, all'alterazione strutturale della membrana e alla maturazione della cervice [17].

Capitolo 2. Rottura prematura della membrana fetale (PROM)

Per la conclusione di una corretta gravidanza è necessario che la membrana fetale mantenga la sua integrità sino all'inizio del travaglio, per poi rompersi solo in seguito alla completa dilatazione della cervice uterina. Durante tutta la gestazione, la membrana deve infatti essere in grado di sopportare le sollecitazioni e i carichi volumetrici sia del liquido amniotico che del feto in continuo sviluppo, nonché le deformazioni causate dei movimenti di quest'ultimo.

La rottura della membrana fetale è un evento necessario per l'avvio del parto e si tratta della diretta conseguenza di un processo di indebolimento programmato dei tessuti che la compongono (Figura 2.1), mediato biochimicamente, in concomitanza alle forze di taglio e stiramento dovute alle contrazioni uterine [18,19].

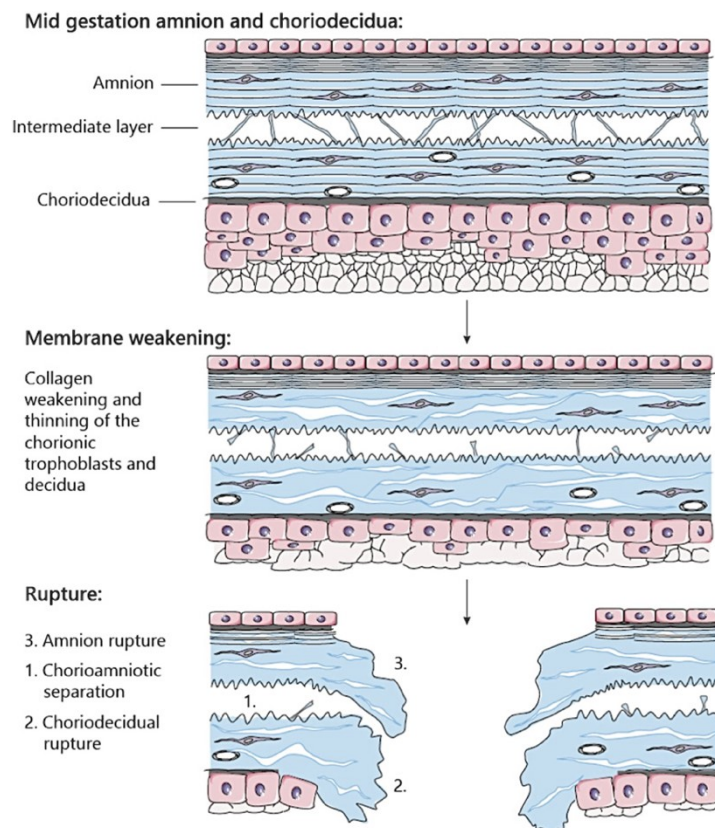


Figura 2.1: Indebolimento e rottura della membrana fetale.

La rottura prematura della membrana fetale (Premature Rupture Of Membranes, PROM) consiste, invece, nella rottura della membrana prima dell'inizio del travaglio. Si tratta di un evento che avviene in circa il 3-4% di tutte le gravidanze, contribuisce al 40-50% delle nascite premature ed è una delle cause principali di morbidità e mortalità neonatale [19].

Nel caso in cui questo evento avvenga prima di 37 settimane di gestazione, il tasso di mortalità del feto è di circa il 2% [20]. Prima di 28 settimane, il 40% dei neonati che sopravvivono alle cure intensive neonatali muore entro i primi 5 anni di vita. Inoltre, per coloro che sopravvivono, è significativamente alto il rischio di sviluppare disabilità fisiche e dello sviluppo; tra queste, ad esempio, malattie respiratorie croniche, paralisi cerebrale, effetti sullo sviluppo neurologico o comportamentale, come compromissione delle funzioni visive, uditive ed esecutive o conseguenze psichiatriche, e malattie cardiovascolari.

La rottura prematura della membrana fetale, oltre che spontanea, può essere anche causata dall'invasione della cavità amniotica con aghi e fetoscopi a fini chirurgici e diagnostici. Tali procedure mettono la membrana a rischio di perdite persistenti, che possono poi causarne la rottura [9,21].

2.1 Rottura iatrogena

Nonostante gli innumerevoli avanzamenti nella chirurgia fetale, la rottura prematura iatrogena della membrana fetale rimane il “tallone d’Achille” di questa branca della medicina. In qualunque intervento, infatti, così come in alcune procedure diagnostiche, ad esempio l’amniocentesi, è necessario che la membrana fetale venga perforata ed è proprio questo a sottoporla ad un maggiore rischio di rottura [22].

I recenti sviluppi nella diagnosi fetale hanno portato ad un incremento globale delle chirurgie fetali minimamente invasive, specialmente per problematiche quali le ostruzioni del tratto urinario inferiore, l’ernia diaframmatica congenita, il mielomeningocele e la sindrome da trasfusione fetto-fetale. Tali procedure vengono eseguite mediante l’inserimento di una telecamera e di strumenti chirurgici all’interno dello spazio amniotico attraverso degli accessi praticati nell’utero e nelle membrane fetali. Gli interventi fetoscopici più complessi necessitano inoltre dell’insufflazione di gas nella cavità amniotica al fine di incrementare la visibilità e agevolare la manipolazione degli strumenti chirurgici. Nonostante lo scopo della fetoscopia sia quello di migliorare gli esiti postnatali, il sito d’entrata del fetoscopio non guarisce mai completamente, anche a causa della scarsa vascolarizzazione delle membrane. Questo porta, in media nel 30% dei casi, alla rottura iatrogena della membrana fetale, con tassi alti anche fino al 85-100%.

Tra le conseguenze di tale rottura c’è l’aumento del rischio di ipoplasia polmonare e di difetti scheletrici causati da oligoidramnios prolungata (ovvero la persistenza del liquido amniotico al di sotto di una soglia corretta, in base all’età gestazionale), di infezioni intra-amniotiche e di

nascite premature. In aggiunta, dato che una delle funzioni principali della membrana fetale è quella di barriera protettiva, una volta che tale barriera venga intaccata, il feto viene esposto ad un maggiore rischio di infezioni. La maggior parte degli interventi vengono inoltre svolti durante il secondo trimestre di gravidanza, quando ancora i feti non sono in grado di sopravvivere al di fuori dell'utero.

Questi sono tutti elementi che mettono seriamente a rischio la salute del feto, annullando così i benefici della fetoscopia; per questo motivo, tali procedure vengono messe in atto soltanto nei casi in cui i rischi di decesso fetale o neonatale o di perdita della funzione degli organi o degli arti siano molto elevati, ma i feti siano comunque sufficientemente sani da poter beneficiare delle cure ricevute. Solo in alcuni fortunati casi avviene la richiusura della ferita, prevalentemente grazie alle contrazioni e agli scorrimenti dei due strati dell'amnion e del chorion l'uno sull'altro [13,22,23,24].

Alcuni elementi che influenzano l'incidenza della rottura iatrogena della membrana fetale sono: la grandezza del foro di accesso, il numero di interventi, la loro difficoltà e durata, il numero degli accessi, la frizione tra le membrane, la presenza di eventuali infezioni vaginali e l'angolo di inserzione del fetoscopio [13,21].

2.1.1 Fattori di rischio e processi coinvolti nella rottura

Ad aumentare sensibilmente il rischio di rottura iatrogena della membrana fetale è la separazione dello strato dell'amnion da quello del chorion, evento che si verifica successivamente al 20-40% di tutte le procedure fetoscopiche. La causa di tale distacco è da ricondursi all'attrito tra le membrane e l'accesso fetoscopico, il quale porta alla degradazione delle aderenze di collagene che tengono uniti i due strati.

L'accesso fetoscopico, in alcuni casi, può condurre anche al danneggiamento delle cellule che circondano la zona in cui viene inserito. Le forze di taglio tra l'accesso fetoscopico e la membrana fetale, durante l'inserimento del fetoscopio o la manipolazione degli strumenti, si pensa infatti che possano causare processi di apoptosi sia nell'epitelio amniotico che nei trofoblasti corionici, oltre ad anomalie nella struttura e nell'organizzazione delle fibre di collagene.

A porre maggiormente a rischio la membrana fetale sono le procedure fetoscopiche più complesse che ne richiedono la distensione liquida o gassosa. Tali procedure causano infatti l'indebolimento della membrana a causa del livello di dilatazione della stessa e dell'eventuale utilizzo di suture o di anidride carbonica riscaldata e umidificata. L'insufflazione può inoltre

causare la disidratazione del collagene amniotico, infragilendolo e rendendolo più incline alla rottura.

Il liquido amniotico che viene perso durante gli interventi viene poi tipicamente rimpiazzato da Ringer lattato riscaldato. Nel corso delle successive 48 ore viene ristabilito il volume originario di liquido amniotico, mentre tale soluzione viene riassorbita dalle membrane ed espulsa attraverso le secrezioni fetali. Tuttavia, si è osservato che l'esposizione a breve termine della membrana fetale a soluzioni a bassa osmolarità, come appunto il Ringer lattato, può portare ad apoptosi nell'epitelio e ad indebolimento del collagene amniotico. Tali problematiche, come precedentemente detto, portano poi ad un incremento del rischio di rottura della membrana fetale [23].

2.1.2 Caratteristiche della ferita

La rottura iatrogena della membrana fetale consiste in una ferita situata nel punto di inserimento dell'ago, più piccola e dai bordi più definiti rispetto a quella dovuta alla rottura spontanea. Il diametro varia da un valore tipicamente di 0.9-0.6 mm, nel caso dell'amniocentesi, fino a 2-5 mm, nel caso degli interventi fetoscopici. Maggiore è il diametro della ferita, maggiore è il rischio di successiva rottura, ovvero di strappo della membrana in seguito a tensione meccanica, che causa l'allungamento della ferita fino anche a diversi centimetri (Figura 2.2). Per questo motivo, negli interventi fetoscopici, è importante sviluppare dei metodi di sigillatura che seguano immediatamente l'intervento, in modo da evitare la fuoriuscita di liquido amniotico dal punto di inserimento e il rischio di allargamento della ferita. In alcuni casi può verificarsi la risigillatura del foro: tale evento non è dovuto alla crescita di nuovo tessuto ma allo scorrimento relativo che si verifica tra l'amnion e il chorion, alle contrazioni o al riattaccamento delle membrane alla decidua uterina [9].

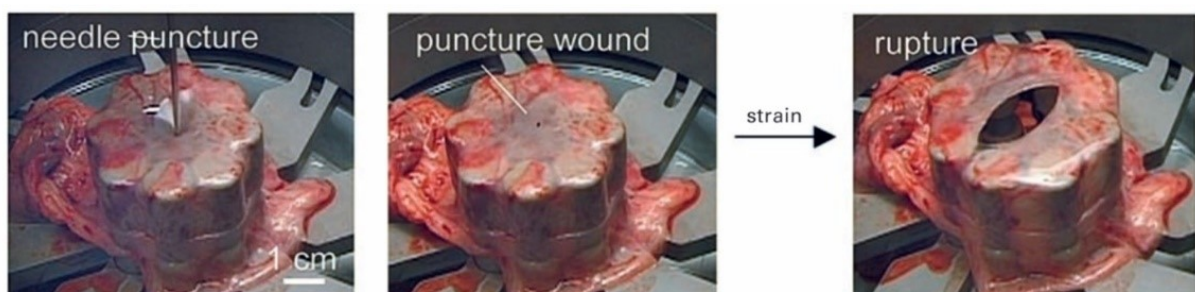


Figura 2.2: Simulazione ex vivo di rottura iatrogena della membrana fetale.

2.2 Rottura spontanea

Per la maggior parte delle gravidanze, l'integrità della membrana fetale viene mantenuta durante tutta la gestazione fino a giungere a rottura durante il travaglio. Tradizionalmente la causa della rottura era stata attribuita dagli ostetrici allo stress fisico associato al parto. Scoperte più recenti hanno dimostrato come tale evento sia invece dovuto anche a processi biochimici, come la distruzione del collagene nella matrice extracellulare dell'amnion e del chorion e la morte programmata di alcune cellule. Il mantenimento dell'integrità della membrana fetale avviene infatti grazie ad un corretto bilanciamento tra i processi di deposizione e rimodellamento della matrice, nei quali sono coinvolti enzimi come le metalloproteasi della matrice (Matrix MetalloProteinases, MMPs) e i loro inibitori. Lo sbilanciamento verso il rimodellamento della matrice extracellulare precede la rottura della membrana.

Le membrane che si rompono prematuramente non risultano comunque indebolite su tutta la superficie, ma principalmente in una zona specifica e focalizzata, considerata la zona di rottura. Tale area risulta morfologicamente estremamente alterata e caratterizzata da gonfiore e rottura delle reti di collagene fibrillare.

Principalmente la rottura prematura spontanea della membrana fetale risulta non essere altro che un'accelerazione e un'esagerazione dei processi che la portano alla rottura durante il parto [13,18,25].

2.2.1 Fattori di rischio e processi coinvolti nella rottura

Disordini alla struttura del tessuto connettivo, in particolare nel contenuto e nella struttura del collagene, causano un indebolimento nella membrana fetale e un livello maggiore di rischio di rottura prematura.

Le gravidanze nelle quali i feti sono affetti dalla sindrome di Ehlers-Danlos¹ rappresentano un esempio di PROM associata ad anomalie nella struttura di collagene della membrana. È stato infatti verificato da uno studio [26] che il 78% dei pazienti analizzati affetti da questa sindrome è stato partorito prematuramente in seguito a rottura prematura spontanea della membrana fetale.

Ad aumentare il rischio di PROM sono inoltre le carenze nutrizionali, che predispongono le donne ad alterazioni della struttura del collagene, ed il fumo di tabacco, che contribuisce ad abbassare la concentrazione di acido ascorbico nel siero materno. L'acido ascorbico è

¹ Disturbo ereditario del tessuto connettivo costituito da un gruppo di almeno undici disordini che portano ad iperelasticità della pelle e delle articolazioni.

necessario per la formazione della struttura a tripla elica del collagene e una sua diminuzione è associata ad un incremento del rischio di rottura prematura della membrana. In aggiunta, il cadmio presente nel tabacco causa una riduzione della disponibilità di rame che contribuisce a sua volta all'alterazione della struttura del collagene nelle membrane fetali delle fumatrici.

Un'altra possibile causa della rottura prematura delle membrane fetali, come detto in precedenza, è da ricondursi allo sbilanciamento tra l'attività delle MMPs della matrice e quella dei loro inibitori tissutali. Mentre l'azione bilanciata dei due è essenziale per i processi di rimodellamento della matrice extracellulare, uno squilibrio porta ad una degradazione inappropriata della matrice extracellulare dell'amnion e del chorion. Nelle membrane rotte prematuramente si è verificato un incremento dell'attività proteasica, in particolare quella della MMP-9, e una diminuzione della concentrazione di TIMP-1 (Tissue Inhibitor of MetalloProteinase, TIMP) nel fluido amniotico. L'incremento dell'attività delle MMPs potrebbe essere dovuto ad una predisposizione genetica.

A lungo è stato dibattuto se le infezioni intrauterine siano una causa o una conseguenza della rottura della membrana. Alcuni studi hanno dimostrato che se l'infezione si presenta entro 12 ore dalla rottura, essa corrisponde ad una causa, mentre, se si verifica dopo 72 ore, rappresenta una conseguenza.

I processi attraverso i quali tali infezioni influenzano la probabilità di rottura della membrana sono diversi e ciascuno di questi induce la degradazione della matrice extracellulare. Alcuni microrganismi già presenti nella flora vaginale, come ad esempio lo streptococco B, secernono proteasi che possono indebolire i tessuti delle membrane fetali attraverso la degradazione del collagene.

Un altro meccanismo può essere la risposta infiammatoria del paziente all'infezione batterica, attraverso la produzione di citochine che aumentano l'espressione di MMP-1 e MMP-3 nelle cellule coriali. L'infezione batterica e la conseguente risposta infiammatoria promuovono inoltre la produzione di prostaglandine che, irritando l'utero e causando la degradazione del collagene, si pensa possano aumentare il rischio di rottura della membrana. In aggiunta, la risposta all'infezione causa la produzione di glucocorticoidi che, all'interno del tessuto dell'amnion, stimolano a loro volta la produzione di prostaglandine.

È stato osservato come, nell'area che circonda la rottura successivamente a PROM, la membrana fetale presenti diverse cellule apoptotiche. L'apoptosi consiste in una forma di morte cellulare programmata coinvolta nel rimodellamento di vari tessuti riproduttivi, compresi l'utero e la cervice. Inoltre, nei casi di rottura prematura della membrana legati a

corioamnionite², la risposta immunologica a tale infiammazione accelera a sua volta la morte cellulare nell'amnion e nel chorion.

La rottura della membrana fetale può essere indotta anche da forze meccaniche. Lo stiramento delle membrane fetali, infatti, incrementa l'attività delle MMP-1 e la produzione delle prostaglandine, in particolare la E₂, rendendo la membrana più debole e propensa a rottura. Inoltre, lo stiramento ripetuto dell'amnion e del chorion può causare un fenomeno noto come "indurimento per deformazione"; tale fenomeno rende la membrana meno elastica e più soggetta a rottura.

Lo stress ossidativo è un ulteriore fenomeno legato alla rottura prematura della membrana fetale. Un bilancio ossidoriduttivo stabile tra le specie reattive dell'ossigeno (Reactive Oxygen Species, ROS) e gli antiossidanti è un requisito fondamentale per il proseguimento di una gravidanza sana. Nei casi di gravidanze ad alta quota, presenza di malattie microvascolari o carenze di nutrienti antiossidanti, che portano ad elevate richieste energetiche, lo stress ossidativo causa un incremento della produzione di ROS e dunque porta ad uno sbilanciamento dell'equilibrio ossidoriduttivo. È stato dimostrato come il collagene sia particolarmente suscettibile ai danni causati dalle molecole ossidanti, dunque un incremento di ROS porta alla compromissione della funzione e dell'integrità delle strutture del collagene, nonché dei tessuti stessi delle membrane fetali. Altre cause di accumulo di stress ossidativo potrebbero essere infezioni, fattori comportamentali, come l'abuso di droghe e alcol o il fumo di tabacco, e un indice di massa corporea troppo alto o troppo basso.

L'eccessiva degradazione del collagene e l'insufficiente rimodellamento del tessuto della membrana fetale, conseguentemente ai processi sopra descritti, causano l'aumento del numero e della dimensione (in larghezza e profondità) di microfratture che si estendono attraverso lo strato spugnoso della matrice extracellulare. Tali microfratture possono poi agire come canali di comunicazione tra gli strati dell'amnion e del chorion attraverso i quali si possono infiltrare le cellule infiammatorie e il liquido amniotico, rendendo la membrana più incline a rottura prematura (Figura 2.3) [2,25,27,28].

² Infezione batterica che si origina nel tratto genitale e urinario inferiore e si sposta poi nella cavità amniotica coinvolgendo le due membrane fetali e il liquido amniotico.

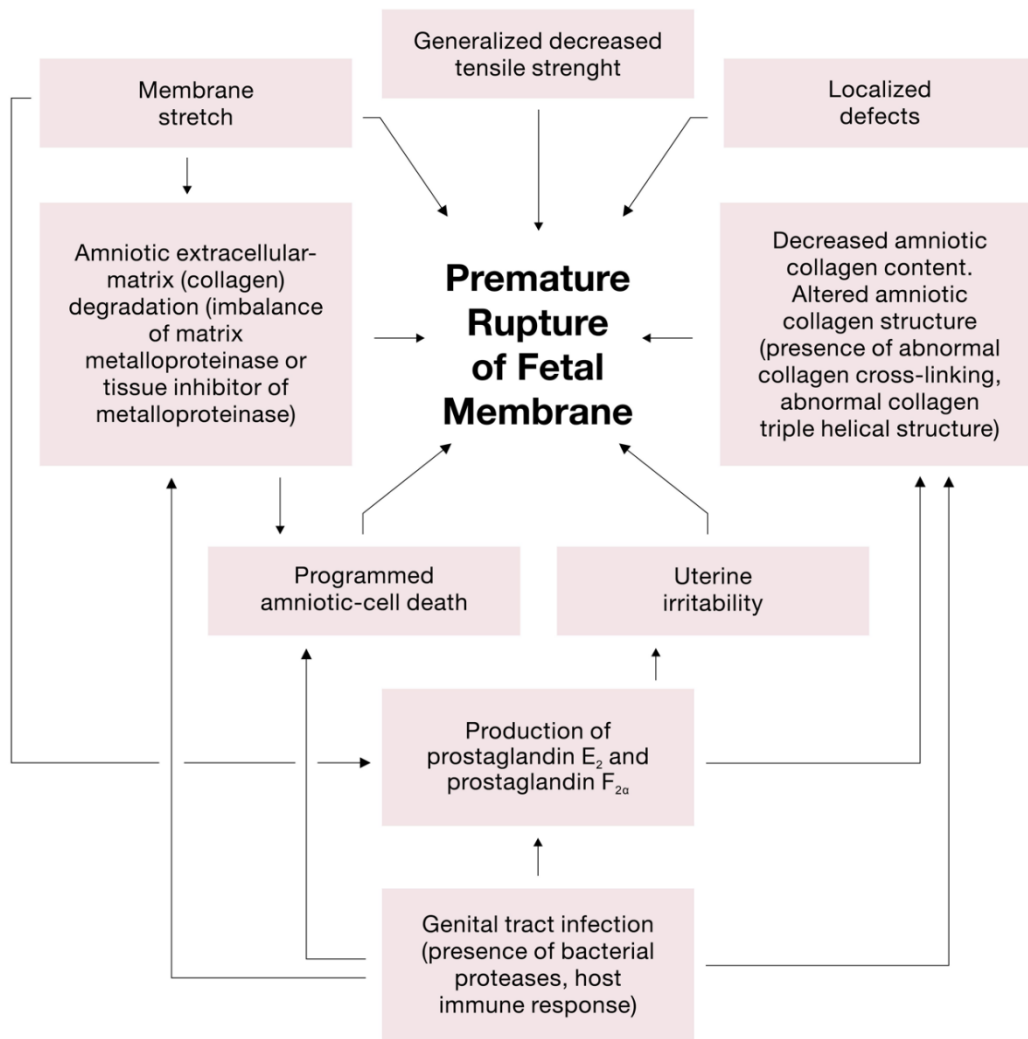


Figura 2.3: Diagramma riassuntivo dei meccanismi che portano a rottura prematura della membrana fetale.

2.2.2 Caratteristiche della ferita

In seguito alla rottura spontanea, la ferita che si forma sulla membrana fetale è larga, lacerata e si allarga fino a diversi centimetri. Il sito della rottura corrisponde ad una zona predefinita situata sopra l'ostio cervicale. I bordi delle ferite risultano irregolari a causa del loro arrotolamento, rendendo così gli interventi di sigillatura più complessi e urgenti da attuare [9].

2.3 Conseguenze per la madre e il feto

La rottura prematura della membrana fetale può causare corioamnionite, un'infezione intra-amniotica che aumenta il rischio di sepsi fetale (dal 2.8% 10%) e di enterocolite necrotizzante (Necrotizing Enterocolitis, NEC)³ nei neonati (dal 7.7% al 11.2%).

³ Patologia causata dall'invasione batterica della parete intestinale che può provocare necrosi dei tessuti.

Dopo la rottura, essendo stata compromessa la barriera protettiva del feto, le superfici della membrana amniotica, corionica, della decidua, della pelle e delle mucose fetali vengono rapidamente colonizzate da batteri.

Qualora la PROM porti a nascite molto premature, l'infiammazione fetale acuta, placentare corionica e le complicanze legate all'infiammazione neonatale, contribuiscono allo sviluppo di danni permanenti al cervello in via di sviluppo nei neonati.

Attualmente risulta che nel 33% dei casi la rottura prematura della membrana fetale porti alla nascita del feto entro una settimana. Qualora essa si verifichi tra le 14 e le 28 settimane di gestazione, uno studio [29] ha verificato che solo il 23% dei neonati è nato vivo e il tasso di mortalità complessivo è risultato essere del 95%. Nello stesso studio, il 69% dei casi è legato a corioamnionite e il 12% delle pazienti ha sviluppato emorragie post-partum.

È stato inoltre verificato che i casi di corioamnionite sono associati ad un rischio maggiore di sviluppo di ulteriori complicanze quali: sindrome da distress respiratorio nei neonati⁴ (aumento del tasso circa del 9%), sepsi neonatale precoce, NEC, severe emorragie intraventricolari (dal 8.4% al 14.5%) e leucomalacia periventricolare (dal 5.7% al 8.4%), un tipo di lesione encefalica con severe conseguenze per i neonati, quali epilessia, ritardo mentale e dello sviluppo, disturbi visivi e paralisi cerebrale. La corioamnionite risulta dunque associata ad un incremento dei tassi di mortalità infantile e di sviluppo di gravi morbidità.

La diminuzione di liquido amniotico causata dalla sua fuoriuscita attraverso la ferita può portare ad oligoidramnios. Qualora prolungata nel tempo, tale condizione può portare a displasia broncopolmonare, con un tasso di mortalità perinatale fino all'80%. La quantità di liquido amniotico residuo è proporzionale al tasso di sopravvivenza fetale e di latenza al parto senza incremento di complicanze materne.

I recenti sviluppi in neonatologia mirano non solo a diminuire l'età gestazionale media alla quale i feti sopravvivono, ma anche ad aumentare la percentuale di neonati sopravvissuti senza conseguenze sulla loro salute [21,26].

⁴ Sindrome che colpisce i neonati prematuri con i polmoni non completamente sviluppati ed è causata dalla mancanza di sufficiente surfattante, sostanza prodotta dai polmoni, che ne permette l'apertura e impedisce il collasso degli alveoli.

Capitolo 3. Trattamenti attuali per la rottura prematura della membrana

3.1 Diagnosi

La diagnosi di PROM viene tipicamente effettuata attraverso un'accurata anamnesi della paziente, un esame fisico e specifici studi di laboratorio. Il sospetto nasce, nella maggior parte dei casi, da un'improvvisa perdita acquosa dalla vagina, di colore giallo pallido o trasparente. Per selezionare le migliori terapie per ciascuna paziente è necessario innanzitutto verificare la presunta data del concepimento. In seguito, il sospetto di PROM viene di solito verificato tramite esame con speculum sterile. Se tale esame accerta la presenza di liquido amniotico nella vagina, la diagnosi viene confermata e non sono necessari ulteriori indagini. Se la diagnosi è, invece, ancora incerta, altri test possono essere effettuati, in particolare: il ferning test⁵ e il test alla nitrazina. La cartina alla nitrazina apparirà di colore blu qualora il pH del campione esaminato sia oltre 6.0: infatti, il pH vaginale in condizioni stabili ha valori che vanno da 4.5 a 6.0, mentre il liquido amniotico, essendo più alcalino, ha pH superiori, intorno a 7.0.

Entrambi questi test possono tuttavia dare falsi positivi in caso di contaminazione di altre sostanze come sangue, liquido seminale o muco cervicale.

Nel caso in cui, dopo aver effettuato tutti i test sopra citati, la diagnosi non possa ancora essere confermata, si può passare ad un esame ecografico. Se anche l'esito di questo esame è incerto, un ulteriore metodo consiste nell'amniocentesi con infusione di indaco carminio all'interno della cavità amniotica. Se il tampone si tinge di blu entro mezz'ora dall'iniezione, il test risulta positivo. Essendo questo un test particolarmente invasivo e soggetto a diversi rischi, come la contrazione di infezioni o l'ingestione da parte del feto di alcune particelle di colorante con conseguenti ripercussioni sul suo sviluppo, quando possibile è preferibile evitarlo.

Un test più recente e ancora scarsamente utilizzato misura la concentrazione di alfa microglobulina-1 placentare (Placental Alpha MicroGlobulin-1, PAMG-1) nelle secrezioni cervico-vaginali. Tale glicoproteina, sintetizzata dalla decidua, ha infatti concentrazioni alte nel fluido amniotico, basse nel sangue materno ed estremamente basse nelle secrezioni cervico-vaginali, quando le membrane sono intatte. Secondo uno studio [30], il PAMG-1 test risulta avere una sensibilità del 97.33% e una specificità del 98.67%, contro una sensibilità del 84% del ferning test e del 86.67% del test alla nitrazina e una specificità del 78.67% del ferning test e del 81.33% del test alla nitrazina [19,20,21,31].

⁵ Valuta la capacità di cristallizzazione del liquido amniotico attraverso l'osservazione al microscopio di un campione di liquido posto su un vetrino e lasciato seccare.

3.2 Terapie

3.2.1 Antibiotici

Ad oggi, gli antibiotici sono considerati il trattamento principale per le pazienti con PROM.

La somministrazione di antibiotici può infatti ridurre il rischio di contrarre infezioni e ritardare l'avvento del parto.

Due diversi studi [32,33] hanno analizzato che l'assunzione di antibiotici riduce l'incidenza di corioamnionite, endometrite postparto⁶, emorragia intraventricolare, polmonite e sepsi neonatale.

Come visto precedentemente, la corioamnionite può portare a gravi conseguenze, anche mortali, come NEC, sepsi, lesioni alla materia bianca del cervello e displasia broncopolmonare; da qui si evince il ruolo fondamentale giocato dagli antibiotici nel contrastare tali patologie.

In particolare, nel contesto di Paesi a basso reddito, dove l'accesso ad altre terapie risulta essere ridotto, gli antibiotici potrebbero prevenire circa il 4% delle morti neonatali dovute a complicazioni legate alla nascita prematura e l'8% di quelle dovute a infezioni.

Non ci sono ancora dati certi su quale sia effettivamente il miglior regime antibiotico. Secondo il National Institute of Child Health and Human Development, una terapia antibiotica efficace consiste nella somministrazione di ampicillina ed eritromicina ogni sei ore per quarantotto ore e successivamente di amoxicillina ed eritromicina ogni otto ore per cinque giorni. Il risultato di tale terapia è l'allungamento della gravidanza per circa tre settimane [19,20,21].

3.2.2 Corticosteroidi

Grazie ai corticosteroidi si osserva una diminuzione di mortalità e morbidità neonatale successiva a PROM. Secondo uno studio [34], i corticosteroidi possono ridurre l'incidenza di emorragia intraventricolare (da 15.9% a 7.2%), di NEC (da 4.6% a 0.8%) e di sindrome da distress respiratorio (35.4% a 20%).

La terapia più comunemente utilizzata consiste nell'iniezione intramuscolare di betametasona o desametasona ogni ventiquattro o dodici ore (rispettivamente) per due giorni consecutivi [20].

⁶ Infezione uterina causata dalla risalita di batteri vaginali subito dopo il parto.

3.2.3 Tocolisi

Secondo le analisi, la terapia tocolitica potrebbe ritardare l'avvento del parto, ma non risulta portare a miglioramenti nei rischi di morbidità neonatale. I dati relativi a questa cura sono comunque piuttosto scarsi; in particolare, non è stato studiato il suo utilizzo in concomitanza ad antibiotici e corticosteroidi [19,20]. La terapia tocolitica dovrebbe pertanto essere utilizzata solo qualora ci fossero evidenti necessità di prolungare la gravidanza di ventiquattro-quarantotto ore; ad esempio, per consentire il trasferimento della paziente ad una struttura specializzata in nascite premature e per consentire lo sviluppo polmonare del feto [35].

In ogni caso, la scelta della terapia specifica varia sensibilmente da un Paese all'altro. Negli Stati Uniti, ad esempio, vengono utilizzati il solfato di magnesio e la nifedipina. La nifedipina risulta avere diversi effetti collaterali, dai più comuni, come febbre e mal di testa, ai più rari, come ipotensione materna e morte fetale; per questo, la dose somministrata deve essere piuttosto bassa. Il solfato di magnesio è consigliato negli avventi di PROM ad età gestazionali precedenti alla trentesima settimana, in quanto risulta abbassare il rischio di sviluppo di paralisi cerebrale nel neonato. In Germania, invece, l'utilizzo di solfato di magnesio nei casi di PROM non è stato approvato per via dell'incremento del rischio per le madri di sviluppare edema polmonare. Viene invece preferito l'atosiban o i β -mimetici, da somministrare per quarantotto ore. Alcuni effetti collaterali riscontrati sono dispnea, tremori, tachicardia, dolori al petto e iperglicemia [19,21,31].

3.3 Trattamenti in base all'età gestionale

Gestire efficacemente la PROM significa trovare un equilibrio tra i vantaggi di prolungare la gravidanza e il rischio di contrarre infezioni intra-amniotiche, considerando le relative conseguenze per la madre e il nascituro [21].

3.3.1 Da 34 a 36 settimane di gestazione

Dalle 34 settimane di gestazione è stato verificato che l'opzione migliore consiste nell'induzione al parto, mentre il prolungamento della gravidanza con somministrazione di terapie (quelle sopra citate) dovrebbe essere evitato. Infatti, uno studio [36] ha dimostrato che, in questi casi, il prolungamento della gravidanza può portare ad un rischio più elevato di contrarre corioamnionite e ad un abbassamento del pH medio del cordone ombelicale, senza, secondo un altro studio [37], un miglioramento in termini di mortalità e morbidità neonatale.

È comunque sempre indicato somministrare alla paziente antibiotici specifici per prevenire l'infezione da streptococco di gruppo B.

Per quanto riguarda il parto, è consigliato trasportare la paziente in una struttura specializzata nella cura dei neonati prematuri e il parto vaginale non sembra avere controindicazioni [20].

3.3.2 Da 32 a 33 settimane di gestazione

Nel caso in cui sia stata verificata la maturità polmonare del feto, nei casi di PROM da 32 a 33 settimane di gestazione, l'opzione migliore risulta ancora essere l'induzione del travaglio, preceduta dal trasporto in una struttura specializzata nella cura dei neonati prematuri.

Nel caso di maturità polmonare non comprovata, i dati sulla gestione migliore della paziente sono insufficienti. Tipicamente si opta per la somministrazione di antibiotici e corticosteroidi per quarantotto ore per poi passare all'induzione del parto oppure, nel caso sia possibile un attento monitoraggio del benessere del feto e della madre, si può considerare la posticipazione del parto a quando si saranno raggiunte le 34 settimane di gestazione [20].

3.3.3 Da 24 a 31 settimane di gestazione

Prima delle 32 settimane di gestazione, il parto potrebbe portare a gravi conseguenze sulla sopravvivenza e la salute del feto, ma risulta comunque necessario nel caso di comprovata corioamnionite. In questi casi, l'obiettivo è il prolungamento della gravidanza fino alle 34 settimane di gestazione, con un controllo sullo sviluppo polmonare del feto a 32 settimane ed un eventuale parto anticipato in caso affermativo.

Alle pazienti vanno somministrati antibiotici e corticosteroidi ed è importante che il benessere della madre e del feto sia costantemente monitorato. Importante è soprattutto porre attenzione all'eventuale comparsa di sintomi di corioamnionite, come temperatura orale superiore ai 38°C, dolore uterino, contrazioni regolari e leucocitosi (Figura 3.1) [20].

3.3.4 Meno di 24 settimane di gestazione

La maggior parte delle pazienti con PROM a meno di 24 settimane di gestazione partorisce dopo al massimo una settimana. È importante avvisare le pazienti che, anche in caso di ritardo del parto, la gravidanza potrebbe comunque non protrarsi abbastanza a lungo da consentire la sopravvivenza sana del bambino. I bambini nati dopo nascite molto premature hanno infatti un elevato rischio di soffrire di problematiche molto serie anche a lungo termine, come anomalie neurologiche e dello sviluppo o paralisi cerebrale. Proporzionale all'età gestazionale è il rischio

di sviluppare anche la sindrome di Potter, una problematica causata dall'oligoidramnios che porta a deformazioni da pressione negli arti e nel viso e ad ipoplasia polmonare⁷ [20].

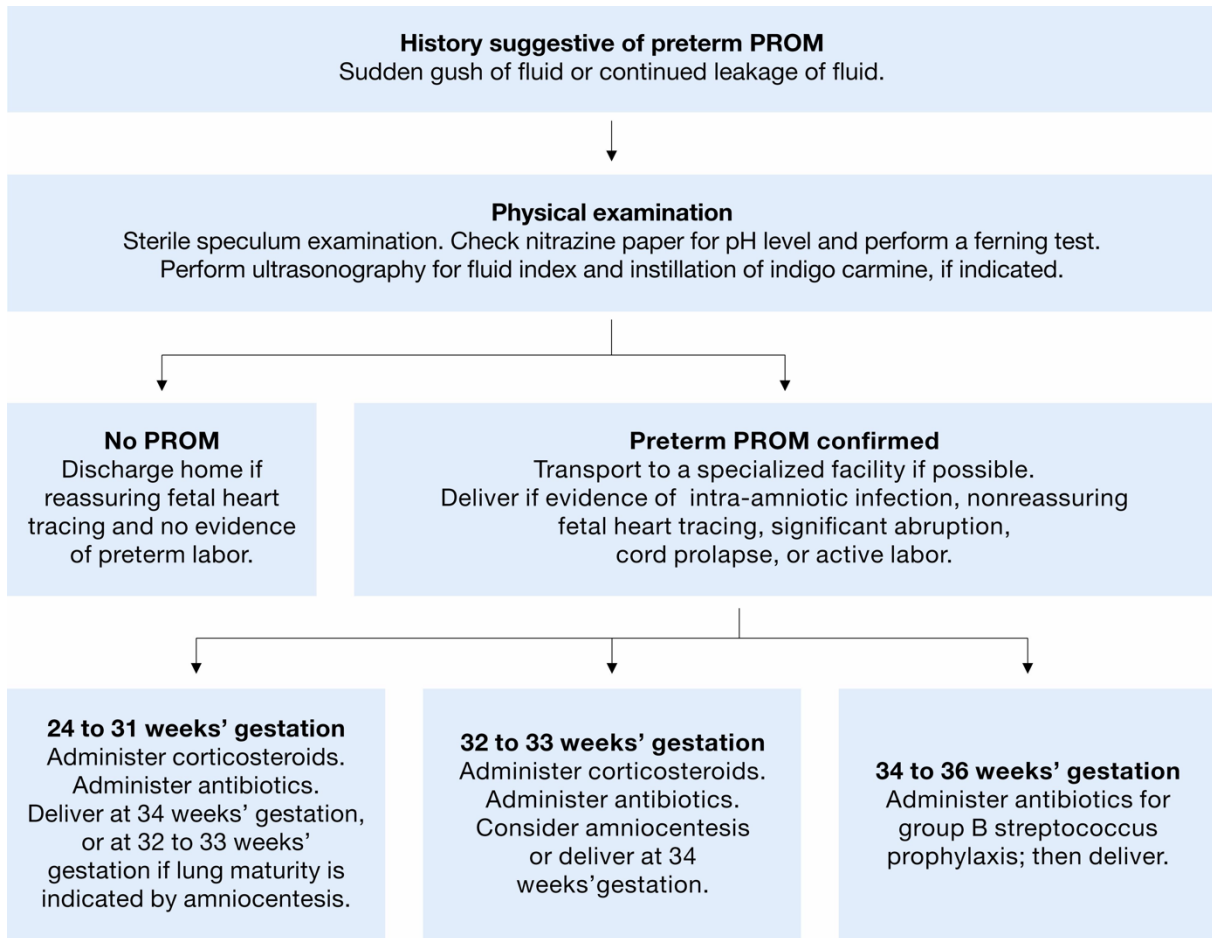


Figura 3.1: Diagramma riassuntivo degli attuali metodi di gestione della PROM.

⁷ Patologia dovuta alla ridotta formazione di tessuto polmonare.

Capitolo 4. Possibili metodi di riparazione con l'utilizzo di biomateriali

4.1 Amniopatch

L'Amniopatch è una tecnica sperimentata per la prima volta nel 1996 e consiste nell'infusione intra-amniotica di una miscela di piastrine autologhe e crioprecipitato, un concentrato derivato dal plasma. Il principio alla base di questo approccio prevede di lasciare che le piastrine identifichino il sito di rottura, nel quale viene meno la continuità dell'endotelio, e il crioprecipitato contribuisca poi alla stabilizzazione del coagulo grazie al suo contenuto di fattori della coagulazione, come il fibrinogeno.

Le candidate ideali per questa tecnica sono le pazienti con rottura prematura iatrogena della membrana fetale avvenuta tra le 16 e le 24 settimane di gestazione, in assenza di infezioni intra-amniotiche. In tali casi, la percentuale di successo dell'Amniopatch risulta essere di circa il 50% [38,39,40].

Nei casi di rottura spontanea, la tecnica risulta invece piuttosto inefficace, a causa delle differenti caratteristiche della ferita da sigillare, che risulta più larga e irregolare, più difficile da raggiungere e tipicamente associata ad infezioni. Le infezioni intra-amniotiche possono infatti interferire con il processo di guarigione dell'Amniopatch attraverso due processi principali: la rapida degradazione del tappo di fibrina e piastrine, causata dagli enzimi fibrinolitici batterici prodotti dall'infezione, e la reazione infiammatoria provocata dai leucociti, che porta ad un ulteriore indebolimento della membrana [39].

Successivamente alla diagnosi di PROM, le pazienti selezionate vengono tenute a riposo per circa una settimana con somministrazione di antibiotici per via endovenosa e monitoraggio continuo dello stato della ferita e del volume di liquido amniotico. Durante questo periodo, se la paziente è idonea alla donazione autologa, vengono preparati concentrati piastrinici e crioprecipitato attraverso plasmaferesi. In caso di non idoneità, si ricorre ad un donatore compatibile. In seguito, viene eseguita una tecnica di amnioinfusione guidata da ultrasuoni con un ago da amniocentesi da 22 gauge (circa 0.72 millimetri di diametro). Il sito di inserzione dell'ago è indipendente dal sito di rottura della membrana. Per prime sono iniettate le piastrine, seguite poi dal crioprecipitato. Qualora venisse osservata bradicardia fetale, la somministrazione di piastrine viene interrotta e sostituita da soluzione fisiologica, utilizzata come diluente. La procedura richiede tipicamente circa 20 minuti a causa della lenta infusione dei prodotti. Nei giorni successivi viene ripreso il riposo a letto e la somministrazione di antibiotici, accompagnati da un monitoraggio giornaliero dell'indice di liquido amniotico e della frequenza cardiaca fetale.

Il protocollo originario prevedeva la somministrazione di un'unità intera di piastrine; dose che è stata poi ridotta alla metà a causa di alcuni decessi fetali probabilmente legati all'attivazione improvvisa di un elevato numero di piastrine [38,39,41]. Le cause precise dei decessi restano sconosciute; tuttavia, la bradicardia acuta e l'ipotensione, osservate in tali casi, possono essere spiegate con la secrezione da parte delle piastrine di sostanze vasoattive come la serotonina, la bradichinina e l'adenosina difosfato. Un ulteriore possibile rischio legato all'utilizzo dell'Amniopatch consiste nella formazione di bande fibrose attorno al cordone ombelicale; tale problematica, ad oggi, è stata verificata solo nei casi di pazienti con sindrome da trasfusione fetto-fetale [38,40,41].

Il successo del trattamento è determinato dall'assenza di ulteriore perdita di liquido amniotico e dal ripristino dell'indice di liquido amniotico originario. L'insuccesso è invece definito come la continua perdita di liquido e/o persistente oligoidramnios [39,42].

L'esatto meccanismo di funzionamento dell'Amniopatch resta per lo più sconosciuto. L'amnion, non contenendo vasi sanguigni, è incapace di stimolare l'attivazione delle piastrine, la formazione di fibrina e il processo di guarigione delle ferite. Probabilmente, le piastrine iniettate riescono, invece, a giungere nel sito di rottura della membrana amniotica, attaccandovisi. Si ipotizza che venga poi innescata la via intrinseca del processo di coagulazione. Tale processo, caratterizzato da una cascata di eventi proteolitici, porta all'attivazione della trombina, enzima in grado di trasformare il fibrinogeno in fibrina. La fibrina, essendo insolubile, permette la successiva formazione del coagulo che funge da tappo per la ferita. Inoltre, le piastrine sono anche una fonte endogena di fattori di crescita e chemiotattici, che a loro volta possono favorire il processo di guarigione della ferita [39,41].

4.2 Collagen plug

La tecnica del collagen plug con shape memory utilizza un dispositivo realizzato in collagene. L'idea alla base del suo funzionamento è quella di sfruttare la proprietà di shape memory, conferite al dispositivo attraverso una serie di trattamenti, iniettando il collagen plug nel sito di rottura e lasciandolo espandere, riprendendo così la sua forma originaria, fino a sigillare la ferita. Anche in questo caso la tecnica risulta più efficace nei casi di rottura iatrogena della membrana in ragione delle caratteristiche di tali ferite; studi in casi di rottura spontanea devono ancora essere approfonditi.

L'utilizzo del collagene di tipo 1 è motivato dalla sua biocompatibilità, facile reperibilità e biodegradabilità e grazie all'impiego di collagene altamente purificato si garantisce inoltre una

risposta infiammatoria minima da parte dell'organismo. In aggiunta, il collagene ha dimostrato capacità di stimolazione per la migrazione di cellule mesenchimali dell'amnion. La sua biodegradabilità, importante elemento da considerare in vista di eventuali gravidanze future, rappresenta tuttavia anche un limite a causa della velocità di degradazione troppo elevata che mitiga l'efficacia del plug nel tempo. Questa caratteristica viene migliorata grazie alle tecniche applicate per conferire proprietà di shape memory al materiale. A tal fine il plug di collagene viene infatti sottoposto a diverse procedure quali reticolazione, congelamento, liofilizzazione e piegatura ed è proprio la reticolazione chimica ad aumentare la forza e il tempo di degradazione del plug, garantendogli una durata tale da coprire le restanti settimane di gestazione.

Grazie alla piegatura, il plug riduce notevolmente le sue dimensioni, permettendone l'inserimento all'interno del difetto attraverso l'uso di un trocar da circa 2.97 millimetri, tipicamente utilizzato in fetoscopia. Per questo motivo, questa tecnica può essere applicata anche in via preventiva immediatamente dopo l'effettuazione di procedure fetoscopiche, facendo passare il plug direttamente attraverso la cannula utilizzata per l'intervento. Una volta che il plug entra in contatto con un fluido polare, quale il liquido amniotico, inizia ad espandersi fino anche a triplicare il proprio diametro entro un minuto, sigillando così la ferita.

Per preparare il plug, le fibrille di collagene di tipo 1 purificate vengono sospese in acido acetico al fine di creare una soluzione uniforme all'1.5% di collagene e sono poi lasciate gonfiare per tutta la notte. La sospensione viene poi omogeneizzata, pressandola attraverso l'ugello di una siringa, e colata in tubi di 9.9 millimetri di diametro. Dopo la rimozione di eventuali bolle d'aria, i tubi vengono congelati a -20 °C per più di quattro ore e successivamente sottoposti a liofilizzazione, un processo che rimuove l'acqua per sublimazione, trasformando così il collagene in una forma secca e stabile. I plug liofilizzati sono poi inumiditi in un buffer di acido 2-morfolinoetan-solfonico (MES), contenente etanolo, a pH di 5.0 e reticolati utilizzando 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimide (EDC) e N-idrossisuccinimide (NHS) per tre ore a temperatura ambiente. Dopo la reticolazione, i plug vengono lavati con soluzione salina e acqua demineralizzata, quindi nuovamente congelati e liofilizzati. Infine, vengono tagliati a 4,5 centimetri di lunghezza e piegati radialmente con una macchina piegatrice a 552 kPa.

Durante la reticolazione chimica si formano legami ammidici tra i gruppi amminici e carbossilici nelle fibrille di collagene. Questo processo riduce la quantità di gruppi idrofilici, creando aree idrofobiche nel plug e rendendolo stabile e compatto. In questo stato il plug è pronto per essere piegato, creando così la deformazione delle interfacce tra le aree idrofobiche e idrofiliche e portando il plug in uno stato energeticamente sfavorevole.

Una volta che il plug piegato entra a contatto con un fluido polare, come il liquido amniotico, le interfacce idrofobiche saranno esposte all'ambiente polare circostante, aumentando l'energia libera di Gibbs, a causa della maggiore solvatazione delle regioni idrofobiche. Questo processo comporta una riduzione dell'entropia del sistema, generando una forza che spingerà il plug a ritornare alla sua forma originale espansa, recuperando le interfacce idrofobiche e idrofiliche. Il plug immerso nel fluido polare si espanderà dunque rapidamente sigillando così il difetto nella membrana fetale [43].

Per migliorare ulteriormente l'efficacia del collagen plug, alcuni studi hanno ipotizzato e sperimentato l'arricchimento del dispositivo con piastrine e cellule del liquido amniotico o con fibrinogeno al fine di aumentare la proliferazione cellulare e favorire ulteriormente la riparazione della membrana [44,45].

4.3 Fibrin sealants

Il possibile utilizzo di fibrin sealants per la gestione della rottura prematura della membrana fetale fu suggerito per la prima volta nel 1979. L'idea alla base è che, grazie all'attivazione del fibrinogeno da parte della trombina, i fibrin sealants abbiano la capacità di mimare l'ultima fase della cascata coagulativa portando alla formazione di un coagulo semirigido di fibrina. La formazione del coagulo dovrebbe dunque permettere di sigillare la membrana ed evitare la fuoriuscita di liquido amniotico [46]. I principali componenti dei fibrin sealants sono il fibrinogeno, la trombina e il fattore XIII, noto anche come "fattore di stabilizzazione della fibrina". Sono inoltre contenuti anche il calcio e la fibronectina, per migliorare l'adesione del coagulo e attivare il fattore XIII [47]. Alcuni studi preliminari includono l'aggiunta di acido ϵ -aminocaproico, un agente antifibrinolitico che incrementa la durata del coagulo, riducendone la degradazione da parte dei fattori della fibrinolisi, che potrebbero essere già stati precedentemente attivati e aver influito nella rottura della membrana. I sigillanti commerciali utilizzano invece, con lo stesso scopo, l'aprotinina, derivante dal tessuto polmonare bovino e, per questo, meno sicura dal punto di vista di biocompatibilità e citotossicità [46].

A differenza di altri adesivi sintetici usati in ambito clinico, i fibrin sealants hanno il vantaggio di essere biocompatibili e biodegradabili, evitando di indurre risposte infiammatorie o reazioni da corpo estraneo.

Nella Tabella 4.1 sono elencati l'origine e la concentrazione dei componenti dei fibrin sealants commerciali attualmente utilizzati.

Componente	Concentrazione	Origine
Fibrinogeno	80-120 g/l	Plasma umano
Fattore XIII	10-30 IU/ml	Plasma o placenta umana
Fibronectina	5-20 g/l	Plasma umano
Trombina	300-600 NIH-U/ml	Plasma umano o bovino
Aprotinina	3,000 KIU/ml	Polmone bovino
Cloruro di calcio	40-60 mM	Inorganico

Tabella 4.1: Componenti, concentrazioni e origini dei prodotti commerciali di fibrin sealants.

La presenza di trombina è un fattore essenziale per regolare la velocità di polimerizzazione del fibrinogeno in fibrina; inoltre, grazie alle sue proprietà mitogene, contribuisce alla guarigione della ferita. Originariamente veniva utilizzata trombina di origine bovina mentre attualmente, la maggior parte dei sigillanti in Europa sono preparati utilizzando trombina derivata dal plasma umano, al fine di evitare potenziali problemi immunologici e, soprattutto, il rischio di trasmissione di patogeni zoonotici.

Il concentrato di fibrinogeno, fibronectina e fattore XIII è ottenuto principalmente da due fonti: il crioprecipitato plasmatico e la frazione I di Cohn. Il crioprecipitato viene prodotto scongelando il plasma a basse temperature e formando successivamente una pasta che contiene fibrinogeno, fibronectina e altri componenti, ma è spesso carente di fattore XIII attivo. La frazione I di Cohn deriva invece dal plasma umano intero, precipitato con etanolo a bassa temperatura e pH neutro, e contiene fibrinogeno e fattore XIII in concentrazioni maggiori. Il processo di produzione dei sigillanti prevede inoltre la purificazione del fibrinogeno, prestando particolare attenzione a non comprometterne la coagulabilità, attraverso diverse fasi di precipitazione e centrifugazione, seguite da solubilizzazione e sterilizzazione virale. Una volta purificato, il concentrato di fibrinogeno viene ulteriormente concentrato tramite ultrafiltrazione e successivamente liofilizzato e dispensato asetticamente in fiale. Le due componenti liofilizzate, il concentrato e la trombina, vengono poi miscelate in situ in presenza di calcio ionizzato, in modo tale da permettere alla trombina di attivare il fibrinogeno facendo sì che polimerizzi in fibrina, formando il coagulo insolubile e stabile [47].

Per l'applicazione del fibrin sealant vengono utilizzate due siringhe, ciascuna contenente uno dei due componenti, attaccate all'estremità di un catetere a doppio lume che viene inserito attraverso il collo dell'utero e fatto avanzare sino al sito di rottura sotto guida ecografica. Successivamente, circa 1-2 ml di ciascun componente vengono iniettati lentamente finché il

coagulo non risulta visibile ecograficamente. Le pazienti vengono poi tenute a riposo per 96 ore sotto antibiotici. Una volta trascorse le ore, qualora non si fosse verificato un aumento apprezzabile di volume di liquido amniotico, la procedura viene eventualmente ripetuta fino ad un massimo di cinque riapplicazioni. Successivamente le pazienti sono tenute a riposo sotto controllo costante sino al parto. Secondo diversi studi, la tecnica risulta nel complesso efficace in circa il 60% dei casi e, in ogni caso, porta ad un aumento del periodo di latenza tra rottura della membrana e parto, migliorando notevolmente le prognosi delle madri e, in particolare, dei feti successivamente a PROM [46].

4.4 Mussel glue

La mussel glue è una sostanza adesiva naturale studiata ed utilizzata in particolare per le sue proprietà di adesione e resistenza in ambienti acquatici. Questa colla biologica prende ispirazione dalle capacità dei molluschi di aderire a diverse superfici, come rocce e scafi di navi, grazie alla produzione di adesivi proteici, chiamati proteine adesive delle cozze (Marine Adhesive Proteins, MAPs). A conferire le proprietà adesive alle MAPs è soprattutto la presenza di 3,4-diidrossifenilalanina (DOPA), un amminoacido derivato dalla tirosina con capacità di formare interazioni dirette tra le sue catene laterali e le superfici. Inizialmente le MAPs vengono secrete come fluidi che induriscono poi in situ, mentre la DOPA contribuisce alla formazione di legami intermolecolari, formando così una placca adesiva solida. La reticolazione intermolecolare della DOPA avviene principalmente tramite la sua ossidazione.

La formazione delle mussel glue si basa sulla sintesi di polimeri di polietilenglicole (PEG), polimeri con proprietà di viscosità controllabile e biocompatibilità, modificati con gruppi terminali di DOPA (Figura 4.1). Al fine di ottenere i polimeri PEG-DOPA vengono utilizzati PEG lineari e ramificati con gruppi amminici terminali. I polimeri risultanti vengono poi polimerizzati in idrogeli. Questo approccio consente di ottenere un materiale biocompatibile, non citotossico e con proprietà adesive molto simili a quelle delle colle naturali dei molluschi [48]. La mussel glue risulta dunque una potenziale candidata per la riparazione della membrana fetale successivamente a PROM. Nonostante ad oggi non siano ancora stati effettuati test in vivo, diversi sono gli studi svolti su membrane artificiali, prove in vitro o su modelli animali.

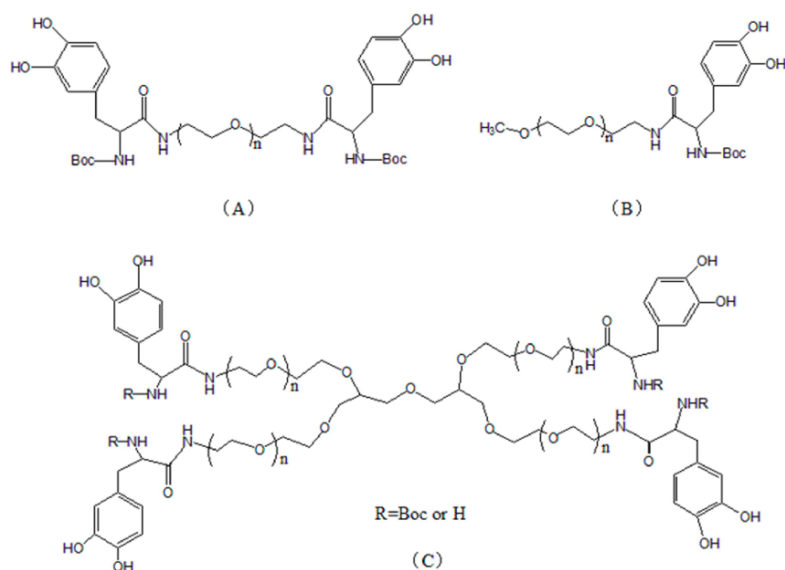


Figura 4.1: Struttura chimica di PEGs modificati con gruppi DOPA nei casi di due (A), uno (B) e quattro (C) bracci.

Per l'applicazione sul sito di rottura vengono miscelati eguali volumi di cPEG (PEG funzionalizzato con DOPA) e soluzione con periodato di sodio, un agente ossidante che induce dunque la formazione di legami covalenti crociati da parte di DOPA, facilitando così la gelificazione del materiale adesivo sulla superficie della membrana [49].

Nel complesso, negli studi *ex vivo*, la mussel glue ha dimostrato di essere biocompatibile, resistente alla degradazione una volta immersa nel liquido amniotico, in grado di aderire alla membrana fetale nonostante l'ambiente acquoso e sigillare la ferita [50].

In confronto alla tecnica con fibrin sealants, la mussel glue sembra avere una durata sensibilmente maggiore (22 giorni contro un massimo di 9) e migliori proprietà meccaniche e adesive. Il principale punto di forza della mussel glue sta nella sua capacità di adattarsi ad ambienti acquosi. Al contrario dei fibrin sealants, la mussel glue, una volta iniettata nel sito di rottura, ha una viscosità iniziale piuttosto bassa; questo permette alla colla di spostare lo strato acquoso sovrastante e stabilire un contatto diretto con la membrana fetale creando così dei legami più saldi e duraturi, prima che inizi la gelificazione. In questo modo, questa tecnica risulta efficace in caso di difetti sia piccoli che più grandi. È stato inoltre dimostrato che il modulo di Young della mussel glue è di circa 57.8 kPa, simile a quello della membrana fetale. Questo conferisce alla colla la capacità di adeguarsi alle deformazioni della membrana durante la gestazione. In più, è anche in grado di resistere a pressioni sino a 60 mbar, simili a quelle ottenute durante le contrazioni uterine [49,51].

Capitolo 5. Casi di studio sull'utilizzo dei possibili metodi di riparazione

Nei prossimi paragrafi verranno illustrati alcuni casi clinici relativi all'applicazione di Amniopatch, collagen plug (con shape memory e arricchito con plasma e fibrinogeno), fibrin sealant, mussel glue, membrana amniotica decellularizzata, ed eventuale supporto in nitinol.

5.1 Amniopatch

5.1.1 Applicazione in vivo in caso di PROM iatrogena a 20 settimane di gestazione

Dopo quattro settimane dallo svolgimento di un'amniocentesi, a 16 settimane di gestazione, ad una donna di 38 anni è stata diagnosticata rottura prematura della membrana fetale, attraverso i test descritti nel Capitolo 3. La paziente è stata inizialmente trattata con antibiotici e, per evitare infezioni ed altre complicanze, ha scelto di sottoporsi alla tecnica dell'Amniopatch.

Processando 1100 ml di sangue in 35 minuti, sono state raccolte 1.44×10^{11} piastrine in 90 ml di sangue. Dopo la deplezione dei leucociti, il concentrato piastrinico autologo è stato conservato sotto agitazione a 60 cicli al minuto a 20-24 °C. Solo un terzo del concentrato è stato poi utilizzato per l'Amniopatch (0.48×10^{11} piastrine in 30 ml).

Dopo aver scongelato e centrifugato 200 ml di plasma fresco, 150 ml di surnatante sono stati rimossi. Il crioprecipitato, che verrà poi conservato a -80 °C e, successivamente, utilizzato, è dunque costituito dai rimanenti 50 ml di surnatante rimanenti, nei quali è stata misurata una concentrazione di fibrinogeno di 680 mg/dl.

Attraverso un'amniocentesi con ago da 22 gauge, sono stati iniettati prima i 30 ml di concentrato piastrinico e successivamente 20 ml di crioprecipitato.

In seguito alla procedura si è verificata, per alcuni giorni, una continua perdita di liquidi fino al totale arresto, avvenuto intorno al decimo giorno. Il trattamento è stato considerato di successo in quanto, attraverso esami con speculum e ad ultrasuoni, si è confermata la chiusura completa della membrana fetale e la gravidanza è proseguita senza ulteriori complicazioni fino alle 36 settimane di gestazione quando, con un parto cesareo, è nato un bambino sano.

Secondo questo caso clinico, l'Amniopatch risulta dunque essere una tecnica sicura ed efficace per trattare la rottura prematura iatrogena della membrana fetale [40].

5.1.2 Applicazione in vivo in 7 casi di PROM spontanea

Sono state confrontate 8 procedure di Amniopatch in 7 casi di PROM spontanea, ad età gestazionali tra le 17 e le 23 settimane (Tabella 5.1), con 22 casi di PROM trattati con le attuali procedure approfondite nel Capitolo 3.

N° caso	Età	GA diagnosi	GA procedura e (AFI) ^a	Infusione	Risultato e (AFI) ^b
1	40	21s 2d	22s 1g (2.8 → 5.9)	NS 200/ P 40/ C 40	Insuccesso (2.3)
2	36	I: 21s 5g	22s 2g (2.5 → 8.3)	NS 50/ P 40/ C 40	Successo (11.1)
		II: 22s 5g	23s 2g (1.1 → 8.6)	NS 50/ P 40/ C 40	Insuccesso (3.03)
3	26	22s 4g	22s 6g (4.3 → 6.4)	NS 50/ P 40/ C 40	Insuccesso (1.9)
4	36	20s 5g	23s 5g (0 → 7.7)	NS 100/ P 40/ C 40	Insuccesso (1.1)
5	33	20s 6g	21s 1g (1.9 → 6.6)	NS 150/ P 40/ C 20	Insuccesso (0)
6	31	17s 2g	22s 2g (4.7 → 11.4)	NS 100/ P 20/ C 20	Successo (11.0)
7	32	23s 0g	23s 2g (0 → 13.8)	NS 100/ P 20/ C 20	Insuccesso (0)

s = settimane; g = giorni; GA = età gestazionale (Gestational Age); (AFI)^a = volume di liquido amniotico prima → dopo l'Amniopatch; NS = soluzione salina (Normal Saline); P = concentrato piastrinico (Platelet concentrate); C = crioprecipitato; (AFI)^b = volume di liquido amniotico 1-7 giorni dopo l'Amniopatch.

Tabella 5.1: Dati riassuntivi del gruppo su cui è stata effettuata la tecnica dell'Amniopatch.

Nei casi in cui è stato effettuato il trattamento con Amniopatch, successivamente alla diagnosi, le pazienti sono state mantenute a riposo per sette giorni con somministrazione di antibiotici e costante monitoraggio del volume di liquido amniotico. Nel frattempo, ogni paziente è stata sottoposta al prelievo di 400-450 ml di sangue, utilizzato poi per preparare, attraverso la plasmaferesi, il concentrato piastrinico e il crioprecipitato.

Per l'infusione è stato utilizzato un ago da amniocentesi da 22 gauge, collegato ad un'estensione con un rubinetto a tre vie. Per creare una tasca adeguata a stabilizzare l'ago di infusione, sono stati inizialmente infusi 50-200 ml di soluzione fisiologica e ampicillina, seguiti poi da 20-40 ml di concentrati piastrinici e 20-40 ml di crioprecipitato.

Nei giorni successivi al trattamento, alle pazienti sono stati somministrati antibiotici, due dosi da 12 mg di corticosteroidi, a distanza di 24 h l'una dall'altra, e terapia tocolitica, solo nei casi in cui si sono presentate contrazioni uterine. La stessa procedura è stata applicata alle pazienti che non si sono sottoposte alla tecnica dell'Amniopatch.

Oltre alla riuscita del trattamento, è stato analizzato e confrontato anche lo stato di salute dei nati, in termini di sviluppo neurologico, suddividendoli in normali e con disabilità lievi, moderate e severe. I risultati sull'analisi dei neonati sono riassunti nella Tabella 5.2.

N° caso	GA parto	Tipo di parto	Genere/peso	Morbilità	Neurosviluppo	Esito nascita
1	23s 2g	Cesareo	M/ 620g	RDS, BPD, PDA	Esame neurologico normale a 33 mesi	Vivo
2	24s 0g	Cesareo	M/ 640g	RDS, BPD, PDA, sepsi	-	Morto dopo 50 giorni
3	27s 0g	Cesareo	F/ 680g M/ 820g	RDS, BPD, PDA RDS, BPD, sepsi	Esame neurologico normale a 12 mesi	Vivo Vivo
4	25s 2g	Cesareo	F/ 610g	RDS, PBD, ROP (G3), sepsi	Esame neurologico normale a 41 mesi	Vivo
5	21s 3g	Vaginale	F/ 463g	-	-	Nato senza vita
6	39s 0g	Cesareo	M/ 3,080g	Nessuna	Esame neurologico normale a 6 mesi	Vivo
7	34s 0g	Cesareo	F/ 1,670g	PDA, sepsi	Disabilità lieve a 5 mesi	Vivo

s = settimane; g = giorni; GA = età gestazionale (Gestational Age); M = maschio; F = femmina; RDS = sindrome da distress respiratorio (Respiratory Distress Syndrome); BPD = displasia broncopolmonare; PDA = dotto arterioso persistente (Persistent Ductus Arteriosus)⁸; ROP(G3) = retinopatia del prematuro (Retinopathy Of Prematurity) di grado 3⁹.

Tabella 5.2: Esiti sulle nascite dei neonati dopo il trattamento con Amniopatch.

In nessuno dei casi trattati con Amniopatch si sono verificate complicazioni materne o fetali legate al trattamento (nel caso 5 la morte del feto non sembra essere legata alla procedura).

Solo uno dei setti casi (caso 6) è stato considerato completato con successo. La paziente, dopo aver ricevuto la diagnosi di PROM spontanea a 17 settimane di gestazione, è stata trattata con Amniopatch una volta raggiunte le 23 settimane di gestazione. Una settimana dopo il trattamento, il volume di liquido amniotico si era ristabilito e la membrana è rimasta sigillata; la paziente è stata così dimessa e ha successivamente partorito un figlio sano a 39 settimane di gestazione, attraverso parto cesareo.

Una paziente (caso 3) con cervice incompetente¹⁰ è stata trattata con Amniopatch dopo la rottura spontanea della membrana, avvenuta prima dell'effettuazione di un cerchiaggio di emergenza¹¹. Il successo della procedura ha portato ad un aumento della pressione amniotica con conseguente protrusione del sacco amniotico nella vagina e necessità di effettuare un secondo cerchiaggio. Dopo una seconda rottura della membrana, è stata nuovamente eseguita la tecnica

⁸ Condizione nella quale il vaso sanguigno che collega l'arteria polmonare all'aorta nel feto non ancora nato, non si chiude, come dovrebbe, subito dopo la nascita.

⁹ Sviluppo anormale dei vasi sanguigni nella retina che, nei casi più gravi, può portare a cecità; il grado 3 indica un livello moderato.

¹⁰ Condizione della quale il collo dell'utero si dilata prematuramente.

¹¹ Procedura chirurgica effettuata con lo scopo di restringere e supportare la cervice dilatata prematuramente.

dell'Amniopatch, che si è tuttavia rivelata inefficace. Nei restanti cinque casi la procedura non ha portato alla chiusura della ferita.

Nonostante il successo dell'Amniopatch nei casi di rottura prematura spontanea della membrana fetale si sia verificato solo in circa il 14.3%, confrontando gli esiti sulla salute dei neonati tra i casi in cui è stata o meno applicata la procedura (Tabella 5.3), si può notare come questi risultino migliori nei casi di trattamento con Amniopatch. Si è infatti verificata un'occorrenza significativamente inferiore di sindrome da distress respiratorio (71.5% contro 100%) e di sepsi precoce neonatale (28.6% contro 95.7%) e nessuno dei neonati ha sviluppato disabilità, al contrario di quelli del gruppo non trattato con Amniopatch.

	Con Amniopatch (n=7)	Senza Amniopatch (n=23)
Maschi	4 (57.1%)	13 (56.5%)
Peso	680 (610-3080)	660 (440-1370)
Ammissione NICU	6 (85.7%)	23 (100%)
Durata in NICU	81 (0-124)	105 (3-116)
Ventilazione assistita	6 (85.7%)	23 (100%)
Mortalità	1 (14.3%)	6 (26.1%)
Morbilità neonatale		
Sindrome da distress respiratorio	5/7 (71.4%)	23/23 (100%)
Displasia broncopolmonare	19/19 (100%)	19/19 (100%)
Dotto arterioso persistente	5/7 (71.4%)	18/21 (85.7%)
Retinopatia del prematuro	4/7 (57.1%)	7/18 (38.9%)
Enterocolite necrotizzante	1/7 (14.3%)	3/23 (13.0%)
Sospetta o comprovata sepsi precoce	0/7 (0%)	22/23 (95.7%)
Sospetta o comprovata sepsi tardiva	2/7 (28.6%)	14/23 (60.9%)
Morbilità composita	2/7 (28.6%)	23/23 (100%)
6/7 (85.7%)		
Grado di disabilità		
Normale	4/4 (100%)	12/16 (75.0%)
Lieve	0/4 (0%)	1/16 (6.2%)
Moderata	0/4 (0%)	3/16 (18.8%)
Grave	0/4 (0%)	0/16 (0%)
Paralisi cerebrale	0/4 (0%)	2/16 (12.5%)
Tutti i dati sono espressi come mediana (intervallo) o numero (%); i casi che non sono sopravvissuti a sufficienza per la valutazione della morbidità non sono stati contati; per valutare il grado di disabilità si sono considerati solo i neonati con un periodo di osservazione maggiore di 12 mesi; NICU = unità di terapia intensiva neonatale (Neonatal Intensive Care Unit); morbidità composita = con due o più delle altre morbidità.		

Tabella 5.3: Confronto degli esiti sulla salute dei neonati tra il gruppo trattato con Amniopatch e quello non trattato.

A causa del ridotto numero di casi e dell'eterogeneità delle caratteristiche delle pazienti selezionate, questo caso di studio può fungere solo da base per l'analisi della possibile applicazione dell'Amniopatch nei casi di PROM spontanea [39].

5.2 Collagen plug

5.2.1 Studio del collagen plug con shape memory

Dopo aver preparato i collagen plug, con le tecniche descritte nel Capitolo 4 (Figura 5.1-A), la loro morfologia e struttura sono state analizzate attraverso microscopia elettronica a scansione; il diametro è stato misurato sia dopo il passaggio di liofilizzazione che dopo quello di piegatura, attraverso l'utilizzo di un calibro. Come controllo sono stati utilizzati collagen plug non trattati con reticolazione chimica. Prima della piegatura, i collagen plug trattati risultavano già con un diametro sensibilmente più piccolo di quelli non trattati (in media 5.8 ± 0.7 mm rispetto a 8.5 ± 0.3 mm); dopo la ripiegatura, invece, i plug con reticolazione chimica avevano un diametro di 1.8 ± 0.2 mm, quelli senza di 1.7 ± 0.2 mm (Figura 5.1-B).

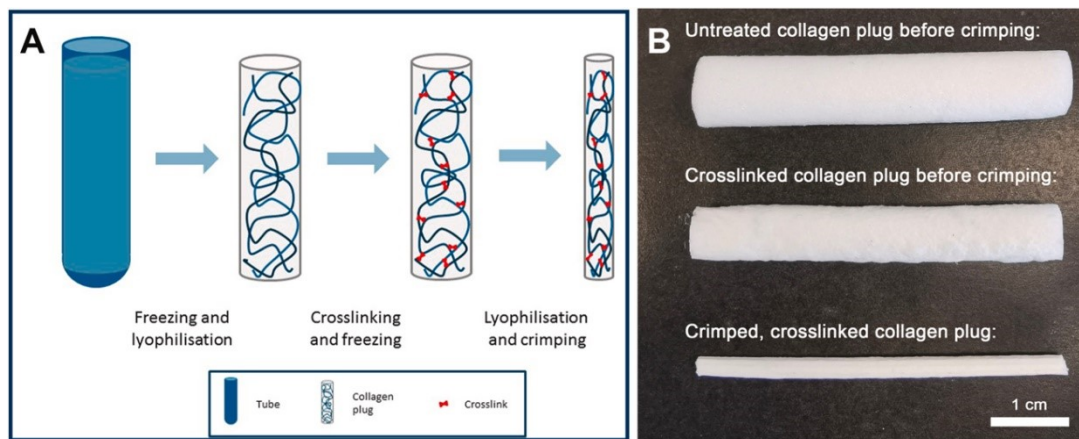


Figura 5.1: (A) Rappresentazione schematica dei passaggi per ottenere collagen plug con shape memory. (B) Vista macroscopica di quelli non trattati, prima della piegatura e di quelli trattati con reticolazione chimica, prima e dopo la piegatura.

Per valutarne l'espansione e l'efficacia nel chiudere i difetti nella membrana fetale, i plug di collagene sono stati testati in diversi modi: immersi in soluzione tampone fosfato (Phosphate-Buffered Saline, PBS), esposti a fluidi di diverse polarità, applicati su un modello creato utilizzando una membrana in polietilene, su un modello creato utilizzando la vescica urinaria di un maiale e su un setup ex vivo utilizzando membrane fetali umane.

Nella soluzione PBS, il diametro centrale del tappo è stato misurato a 0s, 10s, 30s, 1 minuto, 5 minuti e 60 minuti in seguito all'immersione. Già entro i 10 secondi il plug di collagene ha dimostrato di potersi espandere oltre il diametro dei trocar tipicamente utilizzati in fetoscopia; entro un'ora il diametro dei plug con reticolazione è passato da 1.8 mm a 6.5 ± 0.6 mm, quelli non trattati invece sono passati da 1.7 mm a 2.6 ± 0.3 mm, non raggiungendo neanche il diametro dei trocar (circa 3 mm). Per studiare ulteriormente il meccanismo di shape recovery, i plug sono stati immersi in un sistema a due strati di polarità molto diversa: uno strato polare di acqua e

Cu(II)SO₄ e uno strato apolare di triclorometano. L'aggiunta di Cu(II)SO₄ all'acqua aumenta il contrasto visivo tra i due strati, permettendone una migliore distinzione. La parte del plug immersa nel liquido polare ha da subito iniziato ad espandersi, mentre l'altra è rimasta ripiegata e, dopo circa 70 minuti dall'inizio dell'osservazione, la maggior parte del plug è migrata nella metà d'acqua, espandendosi completamente (Figura 5.2).

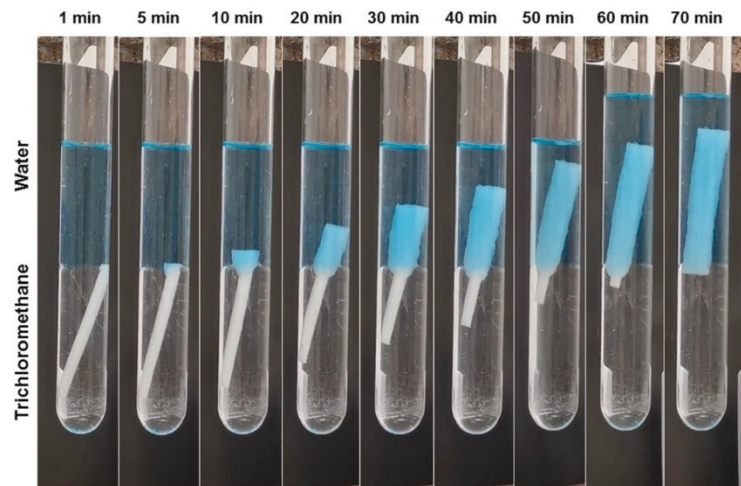


Figura 5.2: Visualizzazione dell'effetto nel tempo della polarità del solvente sulla shape recovery, in un sistema a due strati di acqua (in blu, in alto) e triclorometano (trasparente, in basso).

Per visualizzare poi l'espansione dei plug in una membrana, come prima prova è stata utilizzata una membrana in polietilene a bassa densità, spessa 20 µm, riempita con PBS e perforata con un trocar fetoscopico. Il collagen plug con reticolazione si è espanso fino a sigillare il foro, assumendo una forma a clessidra, mentre quello non trattato è rimasto ripiegato ed è stato rigettato a causa della pressione del fluido (Figura 5.3).

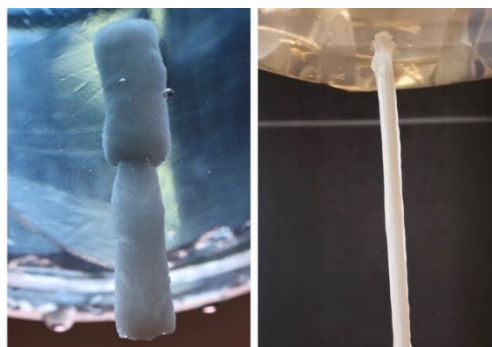


Figura 5.3: Confronto dei collagen plug trattati con reticolazione chimica e non trattati: quello trattato (a sinistra) ha sigillato la ferita nella membrana di polietilene, assumendo una forma a clessidra; quello non trattato (a destra) è rimasto ripiegato ed è stato rigettato.

Per verificare l'efficacia del collagen plug anche in condizioni di pressione più elevata, è stato utilizzato un modello con vescica di maiale. La vescica è stata esposta e riempita con una soluzione di PBS e blu di metilene; successivamente sono stati effettuati due fori con un trocar, dei quali uno è stato sigillato con il collagen plug mentre l'altro è stato lasciato aperto mentre si effettuava una compressione manuale al fine di aumentare la pressione del modello. Il collagen plug, una volta inserito, ha iniziato ad espandersi sigillando la ferita in poco tempo (Figura 5.4).

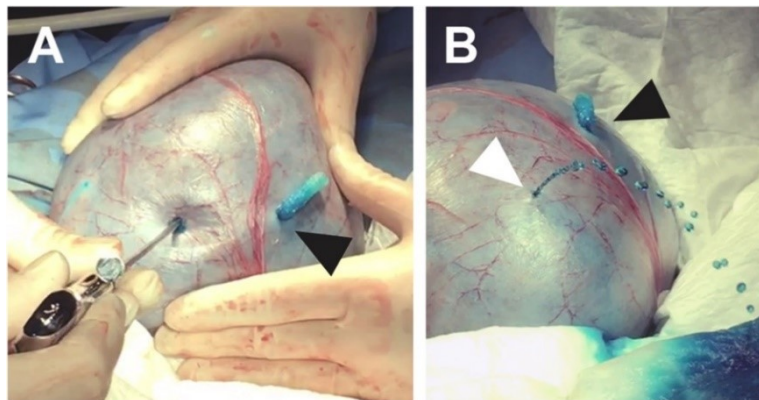


Figura 5.4: Efficacia del collagen plug con shape memory in un modello con vescica urinaria suina (freccia nera) rispetto al controllo non sigillato (freccia bianca).

Infine, i plug sono stati testati in due set up ex vivo utilizzando membrane fetali umane. Nel primo, le membrane, prese tra le 8 e le 24 ore dopo il parto, sono state utilizzate per formare una sacca riempita con acqua; nel secondo sono state utilizzate sezioni di membrane, entro le 4 ore dal parto, fissate ad un cilindro riempito con PBS e Azure A. In entrambi i set up, le membrane sono state perforate con un trocar fetoscopico e i collagen plug sono stati applicati nel difetto. In entrambi i modelli i plug, una volta espansi, hanno sigillato la ferita arrestando la perdita di liquido e non hanno causato ulteriori rotture espandendosi. Il secondo set up ha permesso di osservare che soltanto parte del plug ha assorbito la soluzione tingendosi di blu, questo ad indicare che la fuoriuscita di liquido viene completamente arrestata (Figura 5.5) [43].

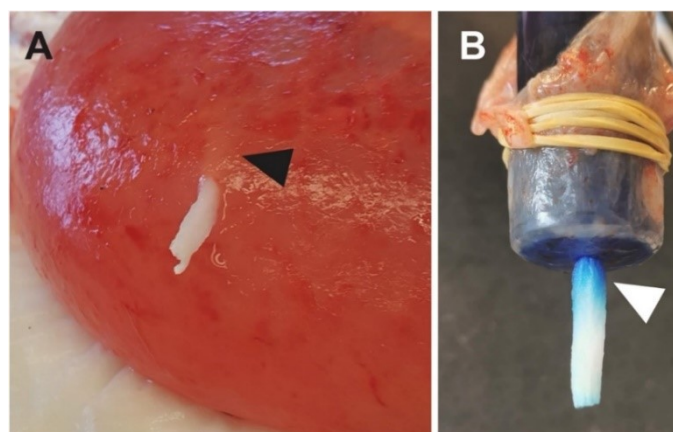


Figura 5.5: Efficacia del collagen plug con shape memory in due set up ex vivo con membrane fetali umane fresche: nel primo la membrana forma una sacca riempita con acqua (A), nel secondo una sezione di membrana è stata fissata ad un cilindro riempito con PBS (B); l'aggiunta di Azure A nel secondo modello permette di osservare la piccola quantità di fluido assorbita dalla parte di collagen plug che fuoriesce dalla ferita (freccia bianca a destra).

5.2.2 Studio del collagen plug arricchito con plasma e fibrinogeno

A causa della loro degradazione nel tempo, l'utilizzo di collagen plug in assenza di riparazione del tessuto della membrana potrebbe essere inefficace. Per questo motivo è stato testato l'utilizzo di collagen plug arricchito con plasma e fibrinogeno, per valutare se questo possa aiutare a generare abbastanza fibrina da riparare la ferita.

Le membrane fetali sono state ottenute da gravidanze giunte al termine, senza PROM, infezioni o altre complicazioni; il plasma è stato ottenuto dal sangue venoso centrifugato di donatori sani; il liquido amniotico è stato raccolto durante interventi per la sindrome fetto-fetale. Plasma e liquido amniotico sono stati frazionati e conservati a -80°C , sino al loro utilizzo. L'esperimento è stato svolto su un modello ex vivo di membrana perforata. La membrana fetale è stata posizionata sopra l'apertura di un contenitore e perforata con un trocar fetoscopico. Al fine di mimare la pressione del liquido amniotico, è stato mantenuto un flusso costante all'interno del contenitore, tramite un'apertura laterale e una pompa d'acqua. Successivamente è stato inserito il collagen plug, arricchito e non, all'interno della ferita. Dopo l'inserimento, è stata misurata la quantità e la velocità di fuoriuscita di liquido sino a cessazione.

Mediante densitometria ottica è stata valutata la concentrazione ottimale di fibrinogeno e plasma per poter generare fibrina. Sebbene la presenza del plasma sia necessaria per la formazione di fibrina, concentrazioni troppo elevate (circa 40%) hanno l'effetto contrario e ne riducono la generazione. I plug di collagene sono dunque stati arricchiti con 1250 mg/ml di fibrinogeno e 4% di plasma.

Nei plug trattati con plasma e fibrinogeno si è osservata formazione e adesione di fibrina alle membrane fetali (Figura 5.6), nonché un ridotto lasso di tempo prima della cessazione della perdita e di tasso di perdita di liquido amniotico di circa un terzo [45].

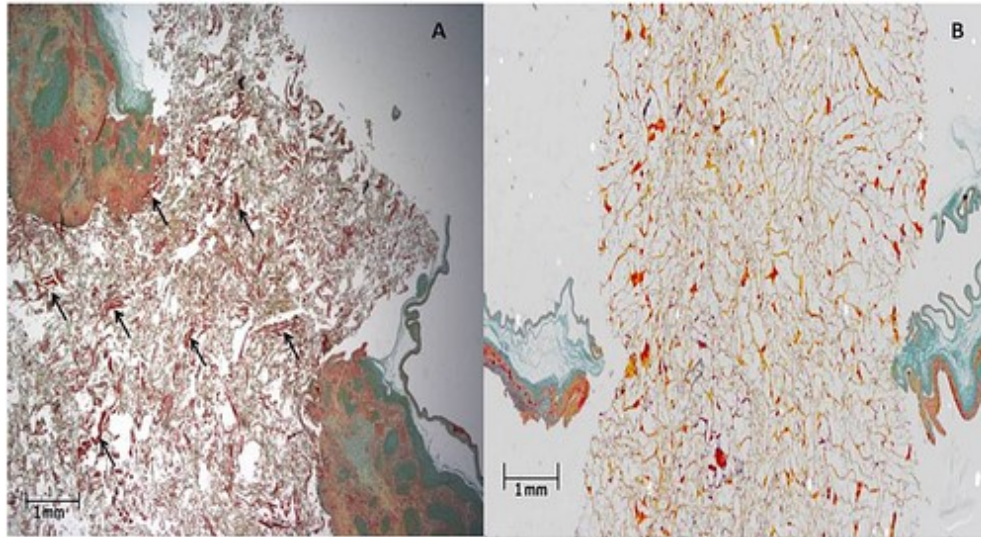


Figura 5.6: Immagine microscopica del sito di applicazione del collagen plug arricchito con plasma e fibrinogeno (A) o con soluzione fisiologica come controllo (B); le frecce nere a sinistra indicano le aree di formazione di fibrina (colorata in rosso) mentre nell'immagine a destra si osserva un'architettura aperta del collagene (colorato in giallo).

5.3 Fibrin sealants

5.3.1 Applicazione in vivo in 7 casi di PROM a meno di 24 settimane di gestazione

Per determinare le migliori concentrazioni dei componenti da utilizzare, inizialmente è stato svolto uno studio su 5 pazienti, delle quali nessuna ha portato a termine la gravidanza. Successivamente, su 12 pazienti (Tabella 5.4) è stato applicato il fibrin sealant ottimizzato.

N° caso	Età (anni)	GA a rottura	Ga al trattamento	N° applicazioni	Complicazioni
1	34	12s 4g	22s 6g	1	Nessuna
2	37	17s 4g	17s 6g	1	Nessuna
3	20	20s 2g	20s 4g	1	Nessuna
4	26	22s 1g	22s 3g	1	Gemelli
5	30	18s 4g	18s 6g	1	Nessuna
6	32	17s 0g	17s 3g	5	Nessuna
7	35	13s 5g	20s 6g	2	Anomalia uterina
8	35	15s 2g	19s 5g	3	Nessuna
9	40	23s 4g	23s 6g	2	Nessuna
10	20	21s 0g	21s 2g	1	Ha lasciato l'ospedale
11	32	21s 5g	22s 4g	1	Nessuna
12	26	22s 1g	22s 6g	1	Nessuna

s= settimane; g = giorni; GA = età gestazionale (Gestational Age).

Tabella 5.4: Dati delle pazienti trattate con fibrin sealant.

L'età gestazionale media al momento di PROM era 19 settimane e 4 giorni, mentre nel momento del trattamento di 20 settimane e 5 giorni. In tutte le pazienti il fibrin sealant ha inizialmente arrestato la perdita di liquido e, qualora necessario, la procedura è stata ripetuta; la media di applicazioni per paziente è stata di 1.7. In due delle pazienti la tecnica è stata efficace, sigillando la ferita entro 48 ore e permettendo il proseguimento della gravidanza, fino a 32 settimane di gestazione per una e fino al termine per l'altra, entrambe senza complicanze. Nel complesso il fibrin sealant è stato in grado di far proseguire la gravidanza in media per 48 giorni dalla rottura e l'età gestazionale media all'avvento del parto è stata 27 settimane e 4 giorni. Le pazienti che hanno partorito oltre le 32 settimane di gestazione sono state 4, tutte con parto spontaneo, e in totale 7 dei 13 neonati sono sopravvissuti (53.8%), tutti, tranne uno (caso 9), con conseguenze dovute alla prematurità. Nella gravidanza gemellare (caso 4), uno dei due gemelli è nato prematuro e sopravvissuto, mentre l'altro è morto poco dopo la nascita, avvenuta 13 giorni dopo il primo. In una sola paziente è stata diagnosticata la corioamnionite (caso 6) e un'altra paziente (caso 10) ha lasciato l'ospedale poco dopo l'applicazione del fibrin sealant per poi ritornare a 30 settimane di gestazione in travaglio e partorire un neonato morto poco dopo la nascita. Nella Tabella 5.5 sono riassunti gli esiti delle varie gravidanze.

N° caso	GA al parto	Latenza	Esito nascita	Complicazioni neonatali
1	32s 1g	63g	Vivo	Prematurità
2	18s 5g	6g	Morto	Estrema prematurità
3	21s 1g	4g	Morto	Estrema prematurità
4	I: 25s 4g	15g	Vivo	Prematurità
	II: 27s 3g	15g	Morto	Sepsi
5	20s 0g	8g	Morto	Estrema prematurità
6	32s 0g	105g	Vivo	Prematurità
7	27s 6g	57g	Morto	Ipoplasia polmonare
8	28s 1g	90g	Vivo	Prematurità
9	38s 4g	105g	Vivo	Nessuna
10	30s 1g	64g	Morto	Ernia diaframmatica
11	26s 4g	36g	Vivo	Prematurità
12	32s 4g	73g	Vivo	Lieve ipoplasia polmonare

s = settimane; g = giorni; GA = età gestazionale (Gestational Age).

Tabella 5.5: Esiti sulle pazienti trattate con fibrin sealant e sui rispettivi nascituri.

Il fibrin sealant non ha causato alcuna reazione ed effetti indesiderati da parte dell'organismo della madre [46].

5.3.2 Applicazione in vivo in caso di PROM a 20 settimane di gestazione

La tecnica del fibrin sealant è stata applicata su una paziente di 30 anni alla prima gravidanza, con PROM a 20 settimane e 3 giorni di gestazione e persistente oligoidramnios. Inizialmente sono stati applicati 2 ml di fibrin sealant commerciale, che hanno efficacemente arrestato la perdita di liquido amniotico per circa una settimana. A 21 settimane e 6 giorni di gestazione, dopo un'improvvisa perdita di liquido, il volume di liquido amniotico era significativamente diminuito; la tecnica è stata dunque ripetuta. La stessa cosa si è verificata a 24 settimane di gestazione. A 34 settimane e 2 giorni di gestazione la paziente ha partorito con parto cesareo in seguito a contrazioni uterine ritmiche, brividi e una temperatura corporea di 39.5 °C. Il neonato, senza deformità visive e di peso di 2274 g, è stato trasferito in terapia intensiva neonatale per poi essere dimesso dopo 8 giorni.

Un tampone cervicale e vaginale effettuato poco prima del parto ha rivelato la presenza di *E. Coli* e un esame della placenta, successivamente al parto, ha permesso la diagnosi di corioamnionite acuta di grado II, suggerendo il fatto che, nonostante l'applicazione del sigillante, si sono comunque verificate infezioni batteriche ascendenti dalla vagina.

Dopo 8 giorni dal parto, anche la madre è stata dimessa e, dopo 12 mesi, è stata effettuata una visita al neonato, che ha dimostrato un normale sviluppo fisico e neurologico.

Il fibrin sealant, nel complesso, è risultato dunque efficace nel sigillare, anche se temporaneamente, la ferita nella membrana fetale e permettere un prolungamento della gravidanza senza conseguenze sulla salute del neonato, evento infrequente nei casi di PROM molto anticipata e con oligoidramnios persistente [52].

5.4 Mussel glue

5.4.1 Confronto ex vivo di mussel glue e fibrin sealant

Per la valutazione ex vivo sono stati prelevati dei campioni di membrana entro 4 ore dal parto cesareo di pazienti sane selezionate. I campioni sono stati fissati ad un cilindro di alluminio e bloccati da un anello; il cilindro è stato riempito con un fluido e la pressione è stata aumentata tramite pompaggio. Al centro dei campioni è stato praticato un foro con un ago da amniocentesi da 1.6 mm di diametro o con un trocar fetoscopico da 3.7 mm di diametro. Immediatamente dopo la foratura, i difetti sono stati sigillati con 125 µl di mussel glue o fibrin sealant. Per confrontare le prestazioni dei due sigillanti, gli esperimenti sono stati svolti sia in condizioni umide che in condizioni asciutte, applicando i sigillanti prima di montare i campioni di membrana sul cilindro riempito d'acqua e dopo aver asciugato con cura le membrane.

Per valutare la capacità dei due sigillanti di resistere a diverse pressioni, la pressione nel cilindro è stata gradualmente aumentata con un flusso costante di 13,9 ml/min sino alla rottura della membrana e alla fuoriuscita di liquido, monitorando continuamente la deformazione dei tessuti tramite immagini digitali laterali (Figura 5.7). I difetti più piccoli sono stati sigillati efficacemente da entrambi i sigillanti sia in condizioni umide che asciutte. I difetti più grandi sono stati riparati efficacemente da entrambi i sigillanti solo in condizioni asciutte.

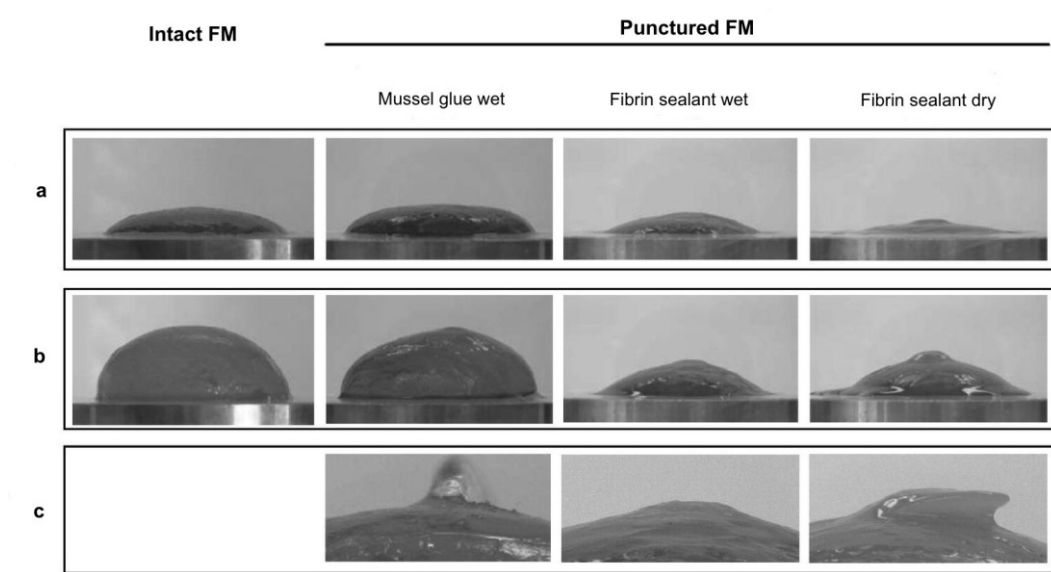


Figura 5.7: Immagini laterali, durante l'insufflazione dei modelli di membrane fetali, riparate con mussel glue, in condizioni umide, e con fibrin sealant, in condizioni umide e asciutte; (a) inizio dell'insufflazione a 0.8 mbar, (b) immediatamente prima della rottura, dove si vede che le membrane riparate con mussel glue possono essere distese similmente a quelle intatte; (c) rottura: la membrana riparata con mussel glue si rompe nel sito di rottura precedente, mentre il fibrin sealant si solleva.

La differenza maggiore si è osservata in condizioni umide, nelle quali il fibrin sealant perdeva di efficacia. Dalle immagini laterali si è infatti potuto osservare come il sigillante in fibrina risultasse rigido, non permettendo alla membrana di deformarsi, mentre la mussel glue creava uno strato sottile sulla superficie della membrana, permettendone la distensione senza distacco. La pressione massima sostenuta dalla mussel glue in condizione umide è stata di 48.6 ± 18.4 mbar, comparabile con quella che si verifica durante le contrazioni uterine, mentre per il fibrin sealant di appena 4.8 ± 6.2 mbar (Figura 5.8).

Questo studio dimostra quindi le migliori prestazioni della mussel glue, in particolare in ambienti umidi, rispetto a quelle dei sigillanti in fibrina, probabilmente per via delle loro composizioni chimiche e cinetiche di gelificazione [51].

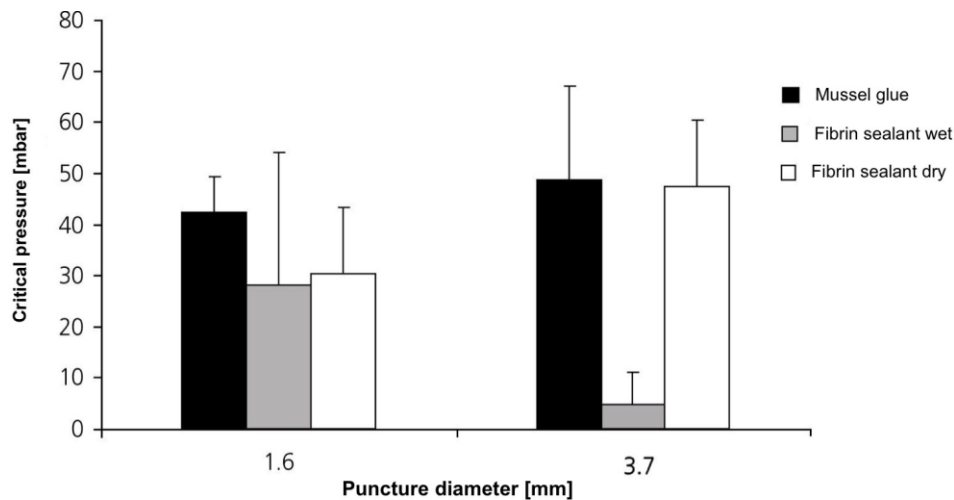


Figura 5.8: Confronto delle resistenze alla pressione di mussel glue e di fibrin sealant, in condizioni umide e asciutte.

5.4.2 Applicazione in vivo su conigli combinando mussel glue o fibrin sealant e DAM

Per migliorare la capacità di sigillare la ferita nella membrana fetale e ripristinarne l'integrità, è stato analizzato l'effetto dell'aggiunta di membrana amniotica decellularizzata (Decellularized Amniotic Membrane, DAM) alla mussel glue, al fine di combinare gli effetti di guarigione e sigillatura; come confronto, i test sono stati svolti anche sul solo utilizzo di mussel glue e sull'utilizzo combinato di fibrin sealant e DAM. Le membrane sono state raccolte successivamente a parti cesarei di donne sane, l'amnion e il corion sono stati separati e l'amnion è stato decellularizzato. Per lo studio sono stati utilizzati 24 conigli di razza White New Zeland a 23 giorni di gestazione, sui quali è stata praticata un'incisione addominale mediana per esporre l'utero. Successivamente, le membrane amniotiche sono state perforate utilizzando un ago da 14 gauge, più piccolo di quelli tipicamente utilizzati in fetoscopia, ma proporzionale alla grandezza dei conigli. Nei gruppi trattati anche con DAM, questa è stata posizionata per prima nel difetto, manualmente con l'aiuto di pinzette, e fissata con una sutura in polipropilene; in seguito, sono stati applicati sopra la mussel glue (Figura 5.9) o il fibrin sealant.

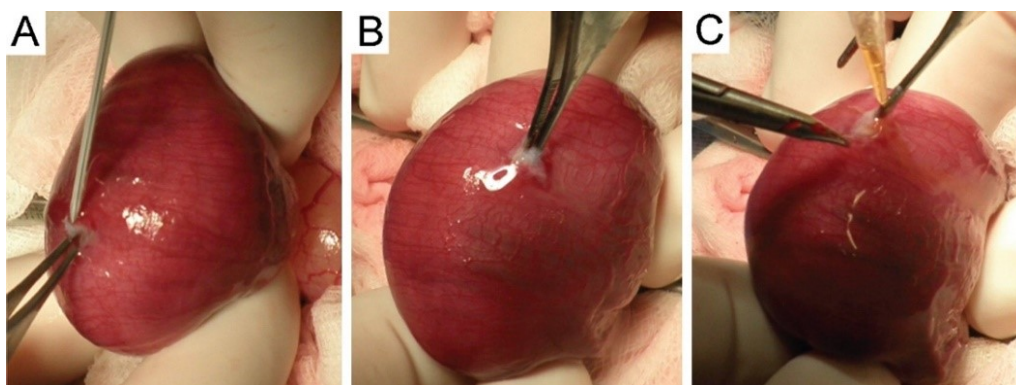


Figura 5.9: Procedura chirurgica di applicazione combinata della mussel glue e della DAM: (a) la membrana viene perforata, (b) viene applicata la DAM con l'utilizzo di pinzette, (c) viene applicata la mussel glue.

L'addome è stato poi richiuso e i conigli sono stati lasciati a riposo per poi subire, sette giorni dopo, l'eutanasia. Solo i sacchi con feti vivi sono stati prelevati ed è stata verificata l'integrità della membrana iniettando soluzione salina miscelata con blu di metilene e verificandone la fuoriuscita dal foro effettuato precedentemente. Tutti i conigli sono sopravvissuti all'intervento, non sono state osservate bande amniotiche o aderenze intra-amniotiche e i feti non hanno mostrato difetti cutanei (Tabella 5.6).

	MG + DAM	MG	FS + DAM
Tasso di sopravvivenza	80%	60%	40%
Sacco amniotico rotto (con feto vivo)	2/8 (25%)	2/6 (33%)	0/6 (0%)
Bande amniotiche	No	No	No
Difetti estetici	No	No	No

MG = mussel glue; FS = fibrin sealant; DAM = membrana amniotica decellularizzata (Decellularized Amniotic Membrane).

Tabella 5.6: Confronto degli esiti dei diversi trattamenti.

Dalle analisi si è osservato come la mussel glue, a differenza del fibrin sealant, sia rimasta saldamente attaccata alla membrana in tutti i casi in cui è stata applicata. Nessuno dei campioni analizzati ha mostrato un rimodellamento tessutale significativo. Nel complesso, il tasso di sopravvivenza fetale non è stato molto alto, tuttavia è risultato simile al gruppo di controllo non trattato.

La natura sintetica della mussel glue potrebbe generare reazioni infiammatorie maggiori rispetto ad altri sigillanti, per questo dovrebbero essere svolti ulteriori studi per periodi di tempo maggiori [49].

5.4.3 Applicazione in vivo su pecore alpine utilizzando un supporto in nitinol

Il modello della pecora risulta migliore rispetto ad altri animali poiché le dimensioni dell'utero sono comparabili a quelle della donna, non avviene guarigione spontanea nella membrana fetale e il periodo di gestazione permette un'osservazione più a lungo termine.

La mussel glue è stata testata utilizzando anche un supporto ad ombrello in nitinol di spessore di 200 μm . Per ottenere le strutture ad ombrello, degli stampi in nitinol sono stati creati, tagliati con un laser e, successivamente, riscaldati per fissarne la forma. Per rendere la superficie più liscia e resistente, gli stampi sono stati ricoperti con un sottile strato di politetrafluoroetilene e, successivamente, sterilizzati. Al fine di aumentare il tempo di gelificazione della mussel glue, per permetterne una manipolazione e applicazione facilitata, è stato alterato il pH della soluzione di reticolazione. Si è osservato come, una riduzione di pH da 7.4 a 6.0 abbia causato un aumento del tempo di gelificazione da circa 15 a 113 secondi. Un pH di 7.0 è stato selezionato, al fine di mantenere un livello compatibile con la fisiologia umana. Nello studio sono state utilizzate 5 pecore alpine ad età gestazionali tra i 56 e i 69 giorni, sulle quali sono stati svolti un totale di 10 impianti in 8 corna uterine.

Una volta sotto anestesia, le membrane fetali delle pecore sono state esposte attraverso isterotomia, per permettere una migliore e facilitata applicazione del sigillante.

Le membrane fetali sono state perforate con un trocar fetoscopico. La soluzione di mussel glue è stata poi applicata all'interno dell'impianto in nitinol e l'ombrello è stato posizionato a contatto con le membrane fetali nel sito di rottura e, successivamente, suturato alla membrana e all'utero, per evitarne lo slittamento (Figura 5.10). Dopo l'applicazione, il liquido amniotico perso è stato sostituito con soluzione salina calda e l'utero è stato richiuso.

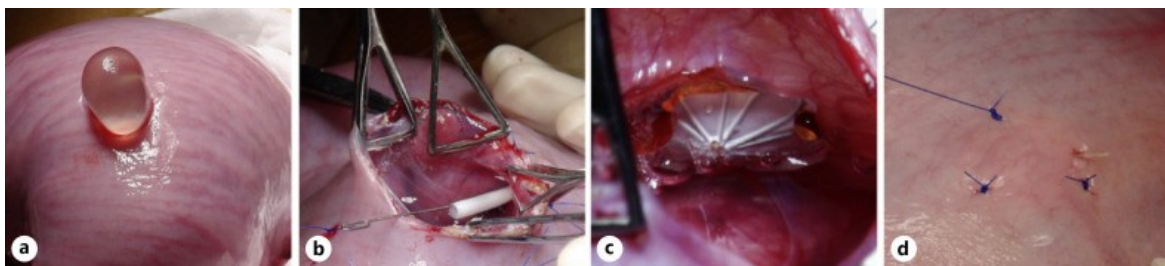


Figura 5.10: Procedura di chiusura dei difetti sulle membrane fetali di pecore: (a) esposizione della membrana attraverso isterotomia, (b) inserimento di un catetere con laccio emostatico, (c) posizionamento dell'ombrello in nitinol riempito di mussel glue, (d) sutura dell'impianto alla membrana.

Tutte le pecore sono sopravvissute all'operazione senza presentare problemi, fino all'eutanasia avvenuta a 10/12 giorni dall'impianto. In nessuna delle pecore si sono verificati aborti spontanei

e la percentuale di feti sopravvissuti è stata del 91%, senza la presenza di bande amniotiche o difetti cutanei. La causa di morte del feto non sopravvissuto non risulta comunque legata all'impianto del biomateriale. Attraverso un test di perdita di liquido amniotico, è stato verificato come tutti gli impianti al momento dell'eutanasia fossero ancora saldamente sigillati (Tabella 5.7).

N° caso	Corno uterino	N° impianti	Adesione visibile	Perdita di fluido amniotico	N° feti vivi	Bande amniotiche	Difetti estetici
1	Destro	1	Si	No	1/1	No	No
	Sinistro	1	Si	No	1/1	No	No
2	Destro	1	No	No	2/2	No	No
	Sinistro	1	No	No	2/2	No	No
3	Sinistro	1	No	No	0/1	No	No
4	Sinistro	1	Si	No	2/2	No	No
5	Destro	2	Si	No	1/1	No	No
	Sinistro	2	No	No	1/1	No	No

Tabella 5.7: Risultati e caratteristiche degli impianti di mussel glue nelle cinque pecore alpine.

La mussel glue è stata ritrovata aderente alle membrane fetali su tutti i campioni, senza segni di deterioramento e infiltrazione cellulare. L'analisi dei campioni ha inoltre rivelato una moderata reazione da corpo estraneo al biomateriale impiantato, con presenza di macrofagi e una maggiore attività proliferativa intorno agli impianti rispetto ai campioni di controllo. Nonostante i risultati promettenti, ulteriori studi a lungo termine, idealmente sino al parto, sono necessari, così come lo sviluppo di metodi di applicazione meno invasivi [50].

Conclusioni

La rottura prematura della membrana fetale rappresenta un serio ostacolo al mantenimento, sino al termine, di una gravidanza sana e allo sviluppo e l'applicazione di interventi fetoscopici, anche in casi di problematiche poco severe. A causa della PROM, la salute di mamma e nascituro, così come la loro sopravvivenza, sono messe a rischio e le attuali soluzioni puntano soprattutto ad una gestione temporanea dei sintomi, cercando di minimizzare le conseguenze. Tale approccio, tuttavia, mantiene comunque significativamente alto il rischio di contrarre infezioni intra-amniotiche o di sviluppo nei feti di disabilità fisiche e/o neurologiche, compromettendone il benessere e le aspettative di vita.

Da qui, il bisogno di sviluppare metodi innovativi, attraverso l'utilizzo di specifici biomateriali. A tal fine, diversi metodi sono stati descritti, confrontati e analizzati nel dettaglio.

L'Amniopatch è una tecnica che utilizza una combinazione di piastrine autologhe e crioprecipitato, al fine di formare un coagulo che riempie e sigilla la rottura, ristabilendo l'integrità della membrana e prevenendo ulteriori perdite di liquido amniotico. Dagli studi analizzati, l'Amniopatch è risultata una tecnica parzialmente efficace nel sigillare la ferita ma che porta ad un netto miglioramento sulla prognosi dei feti, nei quali l'occorrenza di disabilità neurologiche e morbilità, come sindrome da distress respiratorio o sepsi neonatale, è significativamente ridotta.

I collagen plug, in particolare se trattati con reticolazione chimica, per conferirgli proprietà di shape memory, sfruttano la capacità di espandersi rapidamente quando immersi in fluidi polari, come il liquido amniotico, per tappare i difetti nella membrana. Gli esperimenti ex vivo e i dati raccolti hanno dimostrato che i collagen plug sono in grado di arrestare completamente la perdita di liquido amniotico, sigillando la ferita. Risultano, inoltre, essere ancora più efficaci se arricchiti con plasma e fibrinogeno, riducendo il tasso e il tempo di perdita di liquido, nonché promuovendo una migliore adesione alle membrane fetali, grazie alla fibrina. La degradazione del collagene nel tempo può, tuttavia, rappresentare una limitazione all'utilizzo di questa tecnica sul lungo termine.

I fibrin sealants sono formati principalmente da fibrinogeno, trombina e fattore XIII, con l'aggiunta di calcio, fibronectina e, nella maggior parte dei casi, aprotinina. Il loro funzionamento consiste nella formazione di un coagulo di fibrina nel sito di rottura della membrana. La loro biocompatibilità e biodegradabilità li rendono un'opzione sicura per l'uso clinico ma non così efficace nel lungo termine; spesso sono necessarie molteplici applicazioni.

La mussel glue è ispirata alle proteine adesive prodotte dai molluschi e, per questo, ha migliori proprietà adesive rispetto agli altri sigillanti, in particolare in ambienti umidi, come quello della membrana fetale. Gli studi analizzati hanno dimostrato la migliore resistenza di questo prodotto a pressioni simili a quelle raggiunte durante le contrazioni uterine e la maggiore persistenza nel tempo. La natura sintetica potrebbe tuttavia generare risposte infiammatorie maggiori.

Ciascuna delle tecniche analizzate ha mostrato risultati promettenti, in particolare nella chiusura, anche se talvolta temporanea, dei difetti nella membrana e nella riduzione delle conseguenze sulla salute dei feti, legate soprattutto alle nascite troppo premature.

La ricerca futura dovrà dunque concentrarsi sulla validazione e il miglioramento delle tecniche già in sperimentazione, nonché sulla ricerca di eventuali nuovi biomateriali che soddisfino i requisiti richiesti dal caso. Si dovranno sviluppare protocolli clinici standardizzati per garantire soprattutto l'efficacia e la sicurezza di queste tecniche anche nel lungo termine.

L'integrazione nell'uso clinico quotidiano di questi biomateriali, per la gestione efficace della PROM, rappresenterebbe un avanzamento significativo nel campo dell'ostetricia, della chirurgia fetale e della medicina rigenerativa, nonché un'importante risorsa nel miglioramento delle prospettive di gestazione sicura e di successo, a seguito dell'avvento della PROM.

Bibliografia

- [1] Mi, Shengli, et al. "Tissue engineering a fetal membrane." *Tissue Engineering Part A* 18.3-4 (2012): 373-381.
- [2] Menon, Ramkumar, and Lauren S. Richardson. "Preterm prelabor rupture of the membranes: a disease of the fetal membranes." *Seminars in perinatology*. Vol. 41. No. 7. WB Saunders, 2017.
- [3] Danciu, Bianca Mihaela, et al. "Is Spontaneous Preterm Prelabor of Membrane Rupture Irreversible? A Review of Potentially Curative Approaches." *Biomedicines* 11.7 (2023): 1900.
- [4] Pensabene, Virginia, et al. "Repairing fetal membranes with a self-adhesive ultrathin polymeric film: evaluation in mid-gestational rabbit model." *Annals of biomedical engineering* 43 (2015): 1978-1988.
- [5] Mogami, Haruta, et al. "Healing of preterm ruptured fetal membranes." *Scientific reports* 7.1 (2017): 13139.
- [6] Nunes, Vanessa, et al. "Fetal membrane imaging and the prediction of preterm birth: a systematic review, current issues, and future directions." *BMC Pregnancy and Childbirth* 16 (2016): 1-10.
- [7] Young, Bruce K., et al. "Minimally invasive endoscopy in the treatment of preterm premature rupture of membranes by application of fibrin sealant." (2000): 326-330.
- [8] Simhan, Hyagriv N., and Timothy P. Canavan. "Preterm premature rupture of membranes: diagnosis, evaluation and management strategies." *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 112 (2005): 32-37.
- [9] Zisch, Andreas H., and Roland Zimmermann. "Bioengineering of foetal membrane repair." *Swiss medical weekly* 138.41-42 (2008): 596-601.
- [10] Bourne, Gordon. "The foetal membranes: a review of the anatomy of normal amnion and chorion and some aspects of their function." *Postgraduate medical journal* 38.438 (1962): 193.
- [11] Bryant-Greenwood, G. D. "The extracellular matrix of the human fetal membranes: structure and function." *Placenta* 19.1 (1998): 1-11.
- [12] Calvin, Steven E., and Michelle L. Oyen. "Microstructure and mechanics of the chorioamnion membrane with an emphasis on fracture properties." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1101.1 (2007): 166-185.

- [13] Avilla-Royo, Eva, et al. "Biomaterial-based treatments for the prevention of preterm birth after iatrogenic rupture of the fetal membranes." *Biomaterials Science* 10.14 (2022): 3695-3715.
- [14] Menon, Ramkumar, Lauren S. Richardson, and Martha Lappas. "Fetal membrane architecture, aging and inflammation in pregnancy and parturition." *Placenta* 79 (2019): 40-45.
- [15] Bourne, G. L. "The anatomy of the human amnion and chorion." *Proceedings of the Royal Society of Medicine* 59.11 Part 1 (1966): 1127-1128.
- [16] Menon, Ramkumar, Martha Lappas, and Tamas Zakar. "The Role of the Fetal Membranes in Pregnancy and Birth." *Frontiers in physiology* 12 (2021): 653084.
- [17] Truong, Nina, Ramkumar Menon, and Lauren Richardson. "The Role of Fetal Membranes during Gestation, at Term, and Preterm Labor." *Placenta and reproductive medicine* 2 (2023).
- [18] Joyce, Erinn M., John J. Moore, and Michael S. Sacks. "Biomechanics of the fetal membrane prior to mechanical failure: review and implications." *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 144 (2009): S121-S127.
- [19] Garg, Aditi, and Arpita Jaiswal. "Evaluation and management of premature rupture of membranes: a review article." *Cureus* 15.3 (2023).
- [20] Medina, Tanya M., and D. Ashley Hill. "Preterm premature rupture of membranes: diagnosis and management." *American family physician* 73.4 (2006): 659-664.
- [21] Tchirikov, Michael, et al. "Mid-trimester preterm premature rupture of membranes (PPROM): etiology, diagnosis, classification, international recommendations of treatment options and outcome." *Journal of perinatal medicine* 46.5 (2018): 465-488.
- [22] Winkler, Sally M., Michael R. Harrison, and Phillip B. Messersmith. "Biomaterials in fetal surgery." *Biomaterials science* 7.8 (2019): 3092-3109.
- [23] Amberg, Benjamin J., et al. "Why do the fetal membranes rupture early after fetoscopy? A review." *Fetal Diagnosis and Therapy* 48.7 (2021): 493-503.
- [24] Young, Bruce K., et al. "The closure of iatrogenic membrane defects after amniocentesis and endoscopic intrauterine procedures." *Fetal diagnosis and therapy* 19.3 (2004): 296-300.
- [25] Parry, Samuel, and Jerome F. Strauss. "Premature rupture of the fetal membranes." *New England Journal of Medicine* 338.10 (1998): 663-670.

- [26] Barabas, A. P. "Ehlers-Danlos syndrome: associated with prematurity and premature rupture of foetal membranes; possible increase in incidence." *British medical journal* 2.5515 (1966): 682.
- [27] Poma, Pedro A. "Premature rupture of membranes." *Journal of the National Medical Association* 88.1 (1996): 27.
- [28] Devlieger, Roland, et al. "Fetal membrane healing after spontaneous and iatrogenic membrane rupture: a review of current evidence." *American journal of obstetrics and gynecology* 195.6 (2006): 1512-1520.
- [29] Linehan, Laura Aoife, et al. "Neonatal and maternal outcomes following midtrimester preterm premature rupture of the membranes: a retrospective cohort study." *BMC pregnancy and childbirth* 16 (2016): 1-7.
- [30] Abdelazim, Ibrahim A., and Hanan H. Makhoul. "Placental alpha microglobulin-1 (AmniSure® test) for detection of premature rupture of fetal membranes." *Archives of gynecology and obstetrics* 285 (2012): 985-989.
- [31] Thomson, A. J. "Care of Women Presenting with Suspected Preterm Prelabour Rupture of Membranes from 24+ 0 Weeks of Gestation: Green-top Guideline No. 73." *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 126.9 (2019).
- [32] Mercer, Brain M., and Kristopher L. Arheart. "Antimicrobial therapy in expectant management of preterm premature rupture of the membranes." *The Lancet* 346.8985 (1995): 1271-1279.
- [33] Egarter, Christian, et al. "Antibiotic treatment in preterm premature rupture of membranes and neonatal morbidity: a metaanalysis." *American journal of obstetrics and gynecology* 174.2 (1996): 589-597.
- [34] Harding, Jane E., et al. "Do antenatal corticosteroids help in the setting of preterm rupture of membranes?." *American journal of obstetrics and gynecology* 184.2 (2001): 131-139.
- [35] Meller, César H., et al. "Preterm premature rupture of membranes." *Arch Argent Pediatr* 116.4 (2018): e575-e581.
- [36] Naef III, Robert W., et al. "Premature rupture of membranes at 34 to 37 weeks' gestation: aggressive versus conservative management." *American journal of obstetrics and gynecology* 178.1 (1998): 126-130.
- [37] Lieman, Joelle M., et al. "Preterm premature rupture of membranes: is there an optimal gestational age for delivery?." *Obstetrics & Gynecology* 105.1 (2005): 12-17.

- [38] Quintero, Rubén A. "New horizons in the treatment of preterm premature rupture of membranes." *Clinics in perinatology* 28.4 (2001): 861-875.
- [39] Kwak, Hye-Min, et al. "Amniopatch treatment for spontaneous previable, preterm premature rupture of membranes associated or not with incompetent cervix." *Fetal diagnosis and therapy* 33.1 (2013): 47-54.
- [40] Sipurzynski-Budrass, S., et al. "Successful treatment of premature rupture of membranes after genetic amniocentesis by intra-amniotic injection of platelets and cryoprecipitate (amniopatch): a case report." *Vox sanguinis* 91.1 (2006): 88-90.
- [41] Deprest, Jan, et al. "Amniopatch for iatrogenic rupture of the fetal membranes." *Prenatal diagnosis* 31.7 (2011): 661-666.
- [42] Sung, Ji-Hee, et al. "Amniopatch treatment for preterm premature rupture of membranes before 23 weeks' gestation and factors associated with its success." *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology* 56.5 (2017): 599-605.
- [43] Meuwese, Rob TC, et al. "A collagen plug with shape memory to seal iatrogenic fetal membrane defects after fetoscopic surgery." *Bioactive Materials* 20 (2023): 463-471.
- [44] Liekens, Daisy, et al. "Enrichment of collagen plugs with platelets and amniotic fluid cells increases cell proliferation in sealed iatrogenic membrane defects in the foetal rabbit model." *Prenatal Diagnosis: Published in Affiliation With the International Society for Prenatal Diagnosis* 28.6 (2008): 503-507.
- [45] Engels, A. C., et al. "In vitro sealing of iatrogenic fetal membrane defects by a collagen plug imbued with fibrinogen and plasma." *Prenatal diagnosis* 33.2 (2013): 162-167.
- [46] Sciscione, Anthony C., et al. "Intracervical fibrin sealants: a potential treatment for early preterm premature rupture of the membranes." *American journal of obstetrics and gynecology* 184.3 (2001): 368-373.
- [47] Radosevich, M., H. A. Goubran, and T. Burnouf. "Fibrin sealant: scientific rationale, production methods, properties, and current clinical use." *Vox sanguinis* 72.3 (1997): 133-143.
- [48] Lee, Bruce P., Jeffrey L. Dalsin, and Phillip B. Messersmith. "Synthesis and gelation of DOPA-modified poly (ethylene glycol) hydrogels." *Biomacromolecules* 3.5 (2002): 1038-1047.
- [49] Kivelio, A., et al. "Mussel mimetic tissue adhesive for fetal membrane repair: initial in vivo investigation in rabbits." *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 171.2 (2013): 240-245.

- [50] Avilla-Royo, Eva, et al. "In vivo sealing of fetoscopy-induced fetal membrane defects by mussel glue." *Fetal Diagnosis and Therapy* 49.11-12 (2022): 518-527.
- [51] Haller, C. M., et al. "Mussel-mimetic tissue adhesive for fetal membrane repair: an ex vivo evaluation." *Acta biomaterialia* 8.12 (2012): 4365-4370.
- [52] Calado, Elsa, and Diogo Ayres-de-Campos. "Premature rupture of membranes at 20 weeks: report of a successful outcome after transcervical application of fibrin glue." *Fetal diagnosis and therapy* 22.1 (2006): 14-17.